



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

***NEUTRALIZACIÓN DEL VIRUS RESPIRATORIO
SINCITAL HUMANO POR AGENTES DIRIGIDOS
FRENTE A LA PROTEÍNA DE FUSIÓN Y DETECCIÓN
DE DISTINTAS FORMAS DE LA PROTEÍNA F
DISTINGUIBLES POR SU REACTIVIDAD CON
ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES***

DIRECTORES

Dr. José Antonio Melero Fondevila

Dra. Concepción Palomo Sanz

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR QUE PRESENTA
MARGARITA MAGRO DE LA PLAZA**

ABRIL 2009

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. CLASIFICACIÓN DEL VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL HUMANO (VRSH)	1
1.2. EPIDEMIOLOGÍA, ASPECTOS CLÍNICOS Y DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD	2
1.3.BIOLOGÍA MOLECULAR DEL VRSH	4
1.3.1. Genoma	4
1.3.2. Proteínas virales	6
1.4. LA PROTEÍNA F	12
1.5. PROCESO DE FUSIÓN DE MEMBRANAS.....	21
1.6. RESPUESTA INMUNE FRENTE AL VRSH.....	24
1.6.1. Respuesta humoral.....	25
1.6.2. Respuesta celular	27
1.7. MECANISMOS DE NEUTRALIZACIÓN DE VIRUS POR ANTICUERPOS	28
1.8. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO	30
 2. OBJETIVOS	 35
 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	 37
3.1. MATERIALES	37
3.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO	37
3.1.1.1. Líneas celulares.....	37
3.1.1.2. Virus.....	37
3.1.1.3. Bacterias y plásmidos	38
3.1.1.4. Animales	38
3.1.1.5. Anticuerpos	38
3.1.1.6. Péptidos	39
3.1.1.7. Antivirales	39
3.1.2 MEDIOS DE CULTIVO	40
3.1.2.1. Células eucariotas	40
3.1.2.2. Bacterias	40
3.1.3. REACTIVOS	40

3.2. MÉTODOS.....	41
3.2.1. MANEJO DE ANIMALES	41
3.2.2. MANIPULACIÓN DE CÉLULAS Y VIRUS	41
3.2.2.1. Cultivo de células eucariotas	41
3.2.2.2. Cultivo de bacterias.....	42
3.2.2.3. Virus Respiratorio Sincitial humano (VRSH)	42
A) Crecimiento	42
B) Titulación por tinción inmunohistoquímica	42
C) Titulación por producción de antígeno viral	43
3.2.2.4. Virus Vaccinia	43
A) Crecimiento	43
B) Titulación por plaqueo en agar	44
3.2.2.5. Preparación de extractos celulares	44
3.2.3. PURIFICACIÓN Y MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS	44
3.2.3.1. Purificación de anticuerpos monoclonales (AcMs) y policlonales	44
3.2.3.2. Obtención y purificación de fragmentos Fab	45
3.2.3.3. Preparación de columnas de inmunoafinidad	46
3.2.3.4. Purificación de la proteína F _{TM} ⁻ del VRSH.....	46
3.2.3.5. Purificación de anticuerpos que reconocen a la proteína F _{TM} ⁻	47
3.2.3.6. Depleción de anticuerpos anti-Vaccinia (anti-VAC) o anti- VacciniaF (anti-VAC/F)	47
3.2.3.7. Marcaje de anticuerpos con biotina.....	47
3.2.4. TÉCNICAS INMUNOQUÍMICAS	48
3.2.4.1. ELISA.....	48
A) Directo	48
B) Indirecto	48
3.2.4.2. Citometría de flujo	49
3.2.4.3. Ensayo de neutralización	49
A) Durante la infección	49
B) Antes de la infección.....	50
3.2.4.4. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	50

3.2.4.5. Ensayo de inhibición de formación de sincitios por anticuerpos	51
A) Células infectadas	51
B) Células transfectadas	51
3.2.4.6. Resonancia de plasmón de superficie (Biacore).....	52
4. RESULTADOS	53
4.1. NEUTRALIZACIÓN DEL VRSH POR ANTICUERPOS MONOCLONALES Y FRAGMENTOS Fab DIRIGIDOS CONTRA LA PROTEÍNA F	53
4.1.1. Purificación y capacidad neutralizante de anticuerpos monoclonales (AcMs) que reconocen a la proteína F del VRSH	53
4.1.2. Inhibición de la formación de sincitios por AcMs anti-F	58
4.1.3. Comparación de la capacidad neutralizante de AcMs anti-F y fragmentos Fab.....	59
4.1.4. Comparación de las constantes de afinidad de los AcMs 2F y 101F y del fragmento Fab del AcM 101F	61
4.2. NEUTRALIZACIÓN DEL VRSH POR PÉPTIDOS DERIVADOS DE LAS REGIONES HEPTÁDICAS DE LA PROTEÍNA F Y POR COMPUESTOS DE BAJO PESO MOLECULAR	63
4.3. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES QUE RECONOCEN CONFORMACIONES DISTINTAS DE LA PROTEÍNA F DEL VRSH	67
4.3.1. Inmunización de conejos con virus VAC/F _C y purificación de anticuerpos del suero anti-VAC/F _C	67
4.3.2. Depleción de los anticuerpos anti-F _{TM} - de los anticuerpos anti-F _C	68
4.3.3. Capacidad neutralizante de los anticuerpos anti-F _C	70
4.3.4. Unión de los anticuerpos anti-F _C a la proteína F expresada en la membrana de células infectadas con el VRSH	74
4.3.5. Caracterización de los anticuerpos anti-F _C deplecionados de los anticuerpos que se unen a células infectadas con el virus VAC/P.....	75
4.3.6. Caracterización de los anticuerpos anti-F _C deplecionados de los anticuerpos que se unen a células infectadas con el virus VAC/F _C	79

4.3.7. Inhibición de la formación de sincitios por los anticuerpos anti-F _C	83
4.4. COMPARACIÓN DE LAS DISTINTAS FORMAS DE LA PROTEÍNA F RECONOCIDAS POR LOS ANTICUERPOS ANTI-F_{C/ΔTM}- Y ANTI-F_{C/TM}-.....	85
4.4.1. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de las formas de proteína F reconocidas por los distintos anticuerpos anti-F _C	86
4.4.2. Efecto de distintos agentes y pHs sobre la estabilidad de las formas de proteína F reconocidas por los distintos anticuerpos anti-F _C	87
4.5. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS OBTENIDOS POR INMUNIZACIÓN DE CONEJOS CON UN VIRUS VACCINIA QUE EXPRESA UNA PROTEÍNA F SOLUBLE (VAC/F_{TM}-)	89
4.5.1. Depleción de los anticuerpos anti-F _{TM} - del suero anti-VAC/F _{TM} -.....	90
4.5.2. Unión a células infectadas con el VRSH de los anticuerpos anti-F _{TM} ⁻ /NR	91
4.5.3. Capacidad neutralizante de los anticuerpos anti-F _{TM} ⁻ /NR.....	92
5. DISCUSIÓN	95
5.1. NEUTRALIZACIÓN DEL VRSH POR DISTINTOS AGENTES INHIBIDORES DE LA FUSIÓN	95
5.2. ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES QUE RECONOCEN CONFORMACIONES DISTINTAS DE LA PROTEÍNA F	102
6. CONCLUSIONES	109
7. BIBLIOGRAFÍA	111

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
AcM	Anticuerpo monoclonal
AEC	Aminoetilcarbazon
Amp ^R	Resistencia al antibiótico ampicilina
anti-F _C	Inmunoglobulinas del suero anti-VAC/F _C
anti-F _{C/ΔTM} ⁻	Inmunoglobulinas del suero anti-VAC/F _C específicas de la proteína F _{TM} ⁻
anti-F _{C/ΔTM} ⁻	Inmunoglobulinas del suero anti-VAC/F _C deplecionadas de anti-F _{C/ΔTM} ⁻
anti-F _{C/VAC}	anti-F _C deplecionadas de anticuerpos anti-VAC
anti-F _{C/ΔTM} ⁻ /VAC	anti-F _{C/ΔTM} ⁻ deplecionadas de anticuerpos anti-VAC
anti-F _{C/ΔTM} ⁻ /VAC	anti-F _{C/ΔTM} ⁻ deplecionadas de anticuerpos anti-VAC
anti-F _{C/VAC} -F	anti-F _C deplecionadas de anticuerpos anti-VAC/F
anti-F _{C/ΔTM} ⁻ /VAC-F	anti-F _{C/ΔTM} ⁻ deplecionadas de anticuerpos anti-VAC/F
anti-F _{C/ΔTM} ⁻ /VAC-F	anti-F _{C/ΔTM} ⁻ deplecionadas de anticuerpos anti-VAC/F
anti-F _{TM} ⁻	Inmunoglobulinas del suero anti-VAC/F _{TM} ⁻
anti-F _{TM} ⁻ /E	Inmunoglobulinas del suero anti-VAC/F _{TM} ⁻ específicas de la proteína F _{TM} ⁻
anti-F _{TM} ⁻ /NR	Inmunoglobulinas del suero anti-VAC/F _{TM} ⁻ deplecionadas de anti-F _{TM} ⁻ /E
anti-VAC	Inmunoglobulinas dirigidas frente a antígenos del virus vaccinia
anti-VAC/F	Inmunoglobulinas dirigidas frente a antígenos del virus vaccinia-F
ATTC	Colección estadounidense de cultivos tipo
BMS	Bristol-Myers Squibb
cDNA	DNA complementario
cRNA	RNA complementario
°C	Grados Celsius
CDR	Región de los anticuerpos determinante de la complementariedad
col.	Colaboradores
CT	Cola citoplasmática
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilen diamino tetracetato sódico
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
F _C	Proteína de fusión completa
F _{TM} ⁻	Proteína de fusión que carece de la región transmembranal y cola citoplasmática
F _{TM} ⁻ /NN	Proteína F _{TM} ⁻ que tiene cambiados los aminoácidos básicos de los sitios de corte I y II por asparaginas

Fab	Fragmento de anticuerpo que contiene el sitio de unión al antígeno
FDA	"Food and Drug Administration"
GAGs	Glicosaminoglicanos
GCN	Dominio de trimerización
HA	Hemaglutinina
HEPES	4-(2- hidroxietil)-piperazina-1-etano-ácido sulfónico
HN	Hemaglutinina-Neuraminidasa
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFN- γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
i.m	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
K _a	Constante de asociación
K _b	Kilobases
K _d	Constante de disociación
K _D	Constante de afinidad
KDa	KiloDaltons
moi	Multiplicidad de infección
mRNA	RNA mensajero
MWCO	Peso molecular de corte
NDV	Virus de la enfermedad de Newcastle
NK	"Natural killer"
NR	No retenido
OPD	O-fenildiamina
ORF	Fase de lectura abierta
P	Fosfoproteína
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PF	Péptido de fusión
PS	Péptido señal
pE/L	Promotor temprano/tardío
pTM1	Plásmido pTM1
pTM1-F	Plásmido pTM1 con el gen de la proteína F del VRSH
RHA	Región Heptádica A
RHB	Región Heptádica B
RNA	Ácido ribonucleico
RNP	Ribonucleoproteína
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Enzima retrotranscriptasa
SAB	Seroalbúmina bovina fracción V
SC	Suero de cerdo

SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
Th	Linfocito T “helper”
TM	Región transmembranal
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
Tris	Tris(hidroximetil)-aminometano
ufp	Unidades formadoras de placa
vRNA	RNA viral
VAC/F _C	Virus vaccinia recombinante que expresa la proteína F completa
VAC/F _{TM} -	Virus vaccinia recombinante que expresa la proteína F _{TM} -
VAC/F _{TM} -/NN	Virus vaccinia recombinante que expresa la proteína F _{TM} -/NN
VAC/P	Virus vaccinia recombinante que expresa la proteína P
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VPI5	Virus de la parainfluenza tipo 5
VPIh3	Virus de la parainfluenza humana tipo 3
VRSH	Virus respiratorio sincitial humano

Human respiratory syncytial virus (HRSV), a member of the *Pneumovirus* of the *Paramyxoviridae* family, is the main cause of severe lower respiratory tract infections in very young children and is a pathogen of considerable importance in the elderly and in immunocompromised adults. Currently, there is no effective vaccine against the virus, although it is known that passive administration of neutralizing antibodies to individuals at high risk is an effective immunoprophylaxis. The HRSV fusion (F) protein is an attractive target for drug and vaccine development as it is essential for viral entry, is highly conserved, and is the major virus neutralization antigen.

To approach a detailed analysis of neutralization of HRSV infectivity, a panel of monoclonal anti-F antibodies were tested for neutralization. No direct correlation was observed between antibody ELISA titer and neutralizing ability. Therefore, the neutralizing activity of anti F antibodies is likely related to the epitope specificity, and is somewhat independent of their affinity for the F protein. Bivalency is needed to inhibit viral infectivity by weakly neutralizing antibodies (i.e., mAb 2F). However, potent neutralizing antibodies (i.e., mAb 47F and 101F) exert their neutralizing activity even if monovalent. These antibodies bind to the F protein present in the viral membrane, prior to its activation, while F is presumably in its prefusion form.

In contrast, low molecular weight compounds, like HRB F derived peptides and other organic compounds, have to be present during virus entry to inhibit HRSV virus infectivity, suggesting that a conformational change in the F protein in contact with the target membrane is required for these compounds to be effective.

This work also shows that immunization of rabbits with a recombinant vaccinia virus expressing the full-length F protein of HRSV (VAC/F_C) elicits neutralizing antibodies that recognize different conformations of the F protein, a situation similar to that occurred through natural infections in humans. Specific antibodies present in the anti-VAC/F_C serum were separated by affinity chromatography with immobilized F soluble protein. These antibodies allowed us to identify two forms of the F protein which are found in HRSV-infected cells. The most abundant form appears to be the highly thermostable postfusion conformation. The other is less abundant and less thermostable, suggesting that it adopts the prefusion conformation.

The results presented here help to explain the virus neutralizing ability of antibodies specific to the F protein of HRSV, as well as offer a foundation for future searches for neutralizing antibodies. Identification of new, highly potent neutralizing antibodies together with further investigation of the molecular basis of neutralization will help to improve prophylactic antibody treatment to prevent HRSV infection.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CLASIFICACIÓN DEL VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL HUMANO (VRSH)

El virus respiratorio sincital humano (VRSH) pertenece al género *Neumovirus*, de la subfamilia *Neumovirinae*, dentro de la familia *Paramixoviridae*. Los virus de esta familia, junto con los de las familias *Bornaviridae*, *Filoviridae* y *Rabdoviridae* forman el orden *Mononegavirale*, cuyos miembros comparten ciertas características, tales como: (1) tener como genoma una única molécula de RNA de polaridad negativa que se encuentra asociada con la nucleoproteína viral, formando una nucleocápsida helicoidal, que le confiere resistencia a la digestión por RNAsas y a la que está asociada la polimerasa viral; (2) el genoma se transcribe por la acción de la RNA polimerasa viral de forma secuencial dando lugar a RNA mensajeros (mRNA) subgenómicos; (3) el ciclo replicativo es citoplásmico; (4) las partículas virales tienen una envuelta lipídica, que procede de la membrana plasmática de la célula infectada, donde se insertan las glicoproteínas virales; y (5) la entrada en la célula hospedadora se produce por la fusión de las membranas del virus y de la célula.

La familia *Paramixoviridae* comprende dos subfamilias (Figura 1.1): *Paramixovirinae* que incluye el virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la parainfluenza tipo 1-5, virus de las paperas, virus del sarampión, virus Sendai, y virus Hendra y Nipah, y la subfamilia *Neumovirinae*. Ésta, a su vez, está formada por dos géneros: el *Neumovirus*, representado por el virus respiratorio sincital humano (VRSH), así como los virus respiratorios sincitiales, bovino, caprino y ovino y el virus de la neumonía del ratón; y el género *Metaneumovirus*, formado por el metaneumovirus humano y el neumovirus aviar (Collins y Crowe, 2007).

El VRSH se aisló por primera vez en 1956 de un grupo de chimpancés que padecían coriza (Blount y col., 1956) y un año después de aspirados nasofaríngeos de niños con infecciones respiratorias (Chanock y col., 1957). Desde entonces se ha descrito que es el agente causal más importante de infecciones respiratorias graves en niños de corta edad (Henderson y col., 1979a; Boyce y col., 2000; Shay y col., 2001).

Paramixoviridae	Paramixovirinae	Avulavirus	Enfermedad de Newcastle
		Rubulavirus	Parainfluenza humana 2 y 4 Parainfluenza 5, Paperas
		Morbilivirus	Sarampión
		Respirovirus	Parainfluenza humana 1 y 3, Sendai
		Henipavirus	Hendra, Nipah
	Neumovirinae	Neumovirus	Virus respiratorio sincitial humano, bovino, ovino y caprino, Neumonía del ratón
		Metaneumovirus	Metaneumovirus humano, Neumovirus aviar

Figura 1.1. Clasificación de los virus de la familia *Paramixoviridae*, con especial referencia al virus respiratorio sincitial humano (VRSH).

Los aislados del VRSH se han clasificado en dos grupos antigénicos, A y B, basados en el patrón de reactividad con anticuerpos monoclonales (AcMs) (Anderson y col., 1985; Mufson y col., 1985; García-Barreno y col., 1989) y en análisis de secuencias (Cane y Pringle, 1991; Sullender y col., 1991). Dentro de cada grupo también se ha puesto de manifiesto la existencia de variabilidad genética (Cristina y col., 1990, 1991; García y col., 1994; Cane y col., 1994) y antigénica (Storch y Park, 1987; Akerlind y col., 1988; García y col., 1994).

1.2. EPIDEMIOLOGÍA, ASPECTOS CLÍNICOS Y DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD

La infección por el VRSH se presenta como una enfermedad estacional que aparece en brotes epidémicos cada invierno y principios de primavera en zonas de clima templado y en los meses de lluvia en zonas de clima tropical (Kim y col., 1973; Cane y col., 1999). Virus de ambos grupos antigénicos (A y B) pueden cocircular durante una epidemia, siendo frecuente que uno de los dos predomine.

El VRSH es el principal agente causante de infecciones graves del tracto respiratorio inferior en niños de corta edad, produciendo neumonías y bronquiolitis (Henderson y col., 1979a), y es una causa importante de morbilidad y mortalidad en

adultos inmunodeprimidos (Englund y col., 1991) y en ancianos (Falsey y col., 1995). Es un virus ampliamente difundido que infecta a la totalidad de los niños en sus primeros 2-3 años de vida, siendo frecuentes las reinfecciones (Vikerfors y col., 1987; Hall y col., 1991). Es muy contagioso y se transmite persona a persona por la dispersión de secreciones respiratorias o por contacto de las manos con superficies contaminadas y subsiguiente inoculación de la mucosa conjuntiva o nasal (Hall y Douglas, 1981).

El virus entra en las células del epitelio mucoso respiratorio (Neilson y Yunis, 1990) y progresa hacia el tracto respiratorio inferior, probablemente a través de la aspiración de secreciones infectadas (Roberts y col., 1995). El periodo de incubación es de 2 a 8 días, sin embargo la excrección viral puede durar hasta 3 semanas (Domachowske y Rosenberg, 1999).

El espectro de trastornos respiratorios producidos por el VRSH va desde un resfriado común en adultos, hasta cuadros de bronquiolitis y neumonías en lactantes y niños (McIntosh y Chanock, 1990). La sintomatología, sin embargo, es más grave en niños prematuros, ancianos y adultos inmunodeprimidos (Fransen y col., 1967; Garvie y Gray, 1980; Falsey y Walsh, 2000; Falsey y col., 2005). La predisposición genética de cada individuo, la dosis de virus y las coinfecciones con otro tipo de agentes, constituyen distintos factores por los que la infección puede dar lugar a una enfermedad de carácter más grave (Martínez y col., 1988; Greensill y col., 2003).

El diagnóstico de la infección viral se realiza mediante la búsqueda directa del virus o de sus antígenos en secreciones respiratorias. La cantidad de células respiratorias obtenidas condiciona la eficacia de las técnicas. La búsqueda de antígenos del VRSH mediante inmunofluorescencia (IF) o la amplificación de secuencias virales por RT-PCR permite llevar a cabo un diagnóstico rápido (Coiras y col., 2003).

1.3.BIOLOGÍA MOLECULAR DEL VRSH

1.3.1. Genoma

El genoma del VRSH está constituido por una única molécula de RNA no segmentada de polaridad negativa y de aproximadamente 15 Kb (Lambert y col., 1980; Huang y Wertz, 1982 y 1983) que codifica para 11 proteínas virales (Figura 1.2).

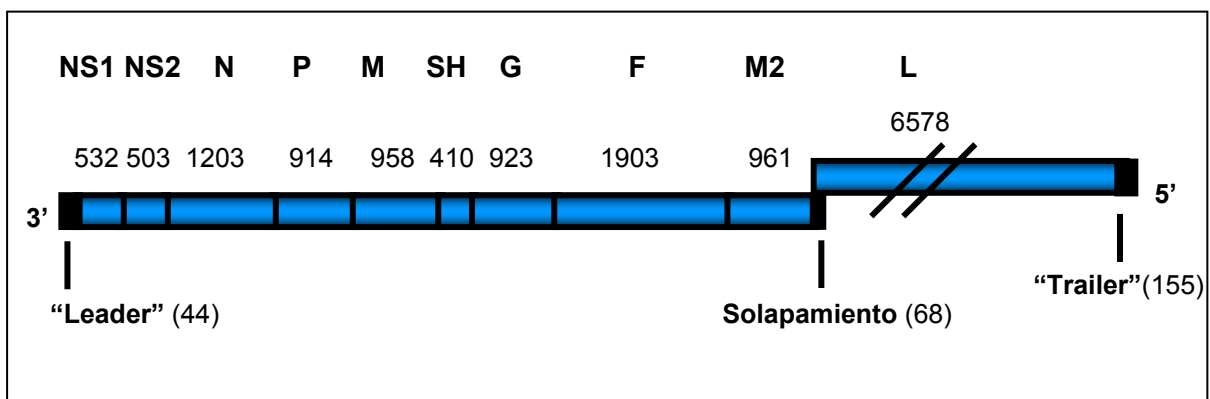


Figura 1.2. Esquema del genoma de la cepa Long del VRSH. Se muestra la disposición lineal de los 10 genes, así como las regiones "leader", "trailer" y de solapamiento entre los genes M2 y L. Se indica el nombre y la longitud (nucleótidos) de cada gen.

El genoma del VRSH se transcribe en 10 RNA mensajeros (mRNA) subgenómicos (Collins y Wertz, 1983; Huang y Wertz, 1983; Venkatesan y col., 1983; Collins y col., 1984a), cada uno de ellos con un marco abierto de lectura (ORF) a excepción del mRNA del gen M2, que tiene dos ORFs y da lugar a dos proteínas, M2-1 ó 22K y M2-2. Los mRNA tienen una estructura CAP en el extremo 5' y están poliadenilados en el extremo 3' debido a la acción de la RNA polimerasa viral (L). Cada gen comienza con una secuencia de 9 nucleótidos denominada "gene-start" (GS) que está altamente conservada en todos los genes, excepto en el gen L (Kuo y col., 1997), y cuya función es controlar el inicio de la transcripción y la adición de CAP. En el caso de los dos últimos genes, M2 y L, hay un solapamiento de 68 nucleótidos (Collins y col., 1987), por lo que la secuencia GS del gen L se localiza dentro del gen M2. Por este motivo, esta secuencia solapante se transcribe dos veces. Todos los genes acaban con una secuencia semiconservada de 12-13

nucleótidos denominada “gene-end” (GE), que dirige la terminación de la transcripción y la poliadenilación del mRNA (Collins y col., 1986; Kuo y col., 1996 y 1997). Los nueve primeros genes del VRSH están separados entre si por regiones intergénicas con longitudes de 1-54 nucleótidos y carecen de secuencia consenso (Moudy y col., 2004).

En los extremos del RNA viral se encuentran dos regiones no codificantes, una región “leader” en el extremo 3’ de 44 nucleótidos, y una región “trailer” en el extremo 5’ de 155 nucleótidos (Mink y col., 1991). Veintiuno de los primeros 24-26 nucleótidos del extremo terminal de ambas regiones son complementarios, lo que indica un alto grado de homología funcional entre las regiones “leader” del RNA genómico y antigenómico.

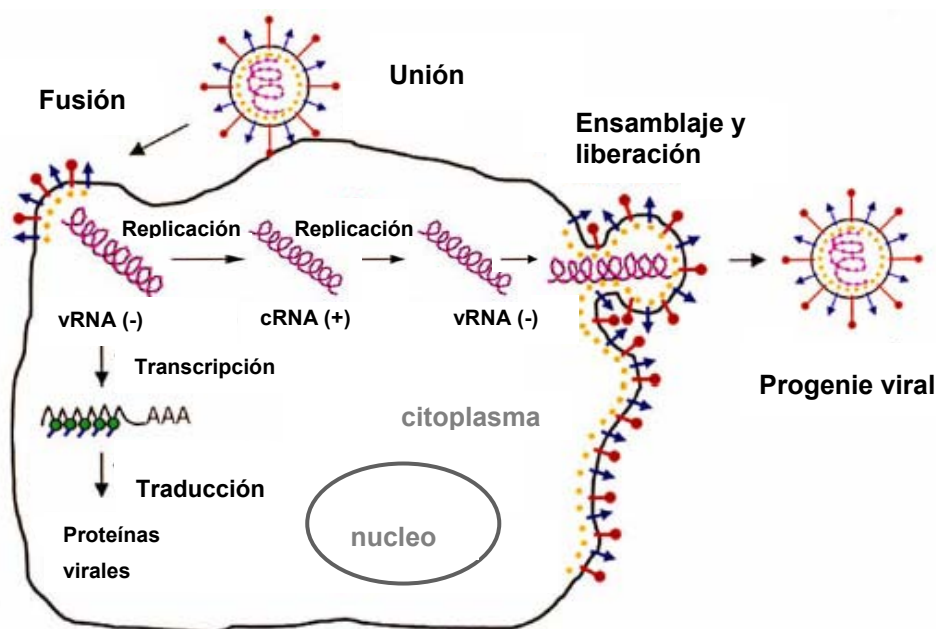


Figura 1.3. Esquema del ciclo replicativo del VRSH. Se representa la unión del virus a la membrana plasmática y la fusión de las membranas viral y celular, lo que permite la entrada de la nucleocápsida en el citoplasma celular. Una vez allí, el RNA viral (vRNA) se transcribe secuencialmente para dar lugar a los distintos RNA mensajeros (mRNA) y posteriormente, se replica a través de un RNA intermediario (cRNA) que es una copia completa de polaridad positiva del genoma del virus. Por último, se muestra cómo se empaquetan las partículas virales y cómo salen de la célula hospedadora por gemación, adquiriendo su envuelta a partir de la membrana plasmática de la propia célula.

En la Figura 1.3 se muestran las etapas del ciclo infeccioso del VRSH. Tras la unión del virus a la superficie celular ocurre la activación de la proteína F, lo que

desencadena la fusión de las membranas viral y celular. Después de la internalización de la nucleocápsida viral en el citoplasma se inicia la transcripción y replicación del RNA viral (vRNA). Mediante estudios de cinéticas de inactivación de la transcripción por luz ultravioleta y caracterización de mRNA policistrónicos, se sabe que la transcripción de los genes del VRSH se realiza de forma secuencial desde un único promotor situado en el extremo 3' del vRNA. En el modelo propuesto, la RNA polimerasa viral pararía y reiniciaría la síntesis del mRNA en cada secuencia intergénica (Dickens y col., 1984). En el caso concreto del gen L, todavía se desconoce cómo la RNA polimerasa transcribe el gen M2 y aparentemente luego retrocede para transcribir el gen L (Fearn y Collins, 1999a). Como en el resto de los mononegavirus, existe un gradiente transcripcional, de manera que los genes más próximos al promotor se transcriben con más frecuencia que los genes más alejados (Collins y Wertz, 1983). Este mecanismo, junto con la presencia de las regiones intergénicas, actúa como regulador de la transcripción (Kuo y col., 1996; Hardy y col., 1999).

La replicación del genoma viral implica la síntesis de un intermediario replicativo encapsidado de polaridad positiva, el antígenoma (cRNA), que es una copia exacta del genoma completo (vRNA). Este último se sintetiza, a su vez, empleando como molde el antígenoma. Ambos se encuentran siempre en forma de nucleocápsidas, y su síntesis se inhibe cuando la nucleoproteína es limitante. Las partículas virales se liberan desde la membrana plasmática por gemación.

1.3.2. Proteínas virales

En preparaciones del VRSH se puede observar una diversidad de formas y tamaños variados que demuestran el carácter pleomórfico del virus. Las partículas virales están constituidas por una nucleocápsida helicoidal recubierta por una envuelta lipoproteica que el virus adquiere al salir de la célula por gemación (Norrby y col., 1970) (Figura 1.4). La nucleocápsida o ribonucleoproteína (RNP) es una hélice simétrica en la que está el RNA viral asociado con la nucleoproteína (N). Otras proteínas asociadas a la RNP son la fosfoproteína (P), que es un cofactor de la RNA

polimerasa viral, la proteína 22k (o M2-1), que es un factor anti-terminador de la transcripción prematura, y la RNA polimerasa viral (L). La proteína matriz (M) forma una cubierta proteica en la cara interna de la envuelta. La envuelta viral contiene en forma mayoritaria dos glicoproteínas transmembranales: la proteína de unión al receptor o proteína G y la proteína de fusión o proteína F; además, hay una tercera glicoproteína minoritaria, de pequeño tamaño y altamente hidrofóbica, denominada proteína SH. Las glicoproteínas están organizadas en espículas virales, que se visualizan como proyecciones cortas (11-20 nm) y poco separadas entre sí (6-10 nm). Existen tres proteínas no estructurales (NS1, NS2 y M2-2) que se producen en la célula infectada pero que no se incorporan al virión.

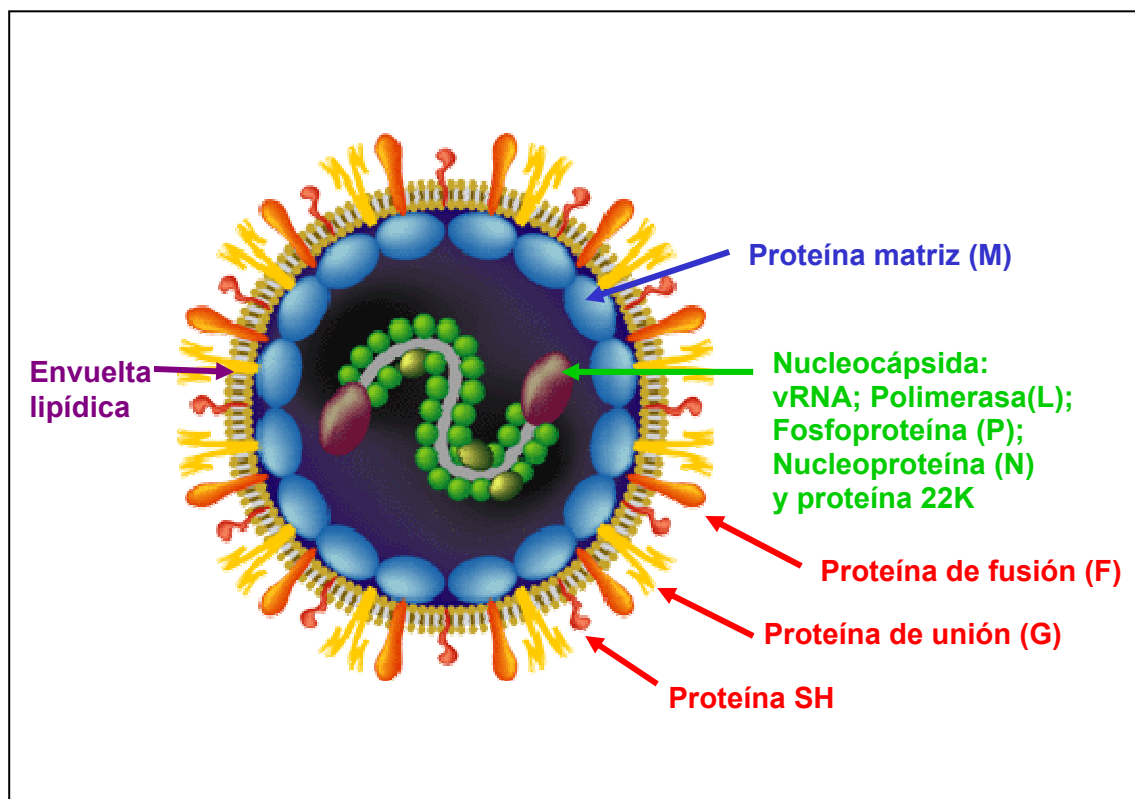


Figura 1.4. Representación esquemática de la partícula del VRS. Se señala la localización de las proteínas estructurales que componen el virión.

A continuación se indican brevemente las principales características de las 11 proteínas codificadas por el genoma del VRS:

Proteína SH: Es una glicoproteína de membrana tipo II de pequeño tamaño (64 aa para el subgrupo A y 65 aa para el subgrupo B) con su extremo carboxi-terminal expuesto al medio extracelular (Collins y Mottet, 1993). Se expresa abundantemente en la superficie de células infectadas por el VRSH, pero se incorpora en pequeña cantidad en la membrana del virus (Olmsted y Collins, 1989). Algunos estudios sugieren que la proteína SH, junto con la proteína F y G, está implicada en la fusión de membranas (Heminway y col., 1994; Techaarpornkul y col., 2001) y que produce cambios en la permeabilidad de la membrana a compuestos de bajo peso molecular (Pérez y col., 1997; Gan y col., 2008); sin embargo, virus a los que se les ha deleccionado el gen que codifica para la proteína SH no pierden la viabilidad ni la capacidad de formar sincitios (Bukreyev y col., 1997; Karron y col., 1997; Jin y col., 2000) indicando que la proteína SH no es necesaria para que el virus infecte las células. Estudios más recientes sugieren que la proteína SH está implicada en la inhibición de la apoptosis mediada por el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) (Fuentes y col., 2007).

Proteína matriz (M): Es una proteína de 256 aa que se localiza en la cara interna de la envuelta del virus (Lambert y col., 1988). Contiene un dominio hidrofóbico en la región carboxi-terminal que probablemente interaccione con la cara interna de la membrana plasmática de células infectadas con el VRSH (Marty y col., 2004). Favorece la asociación entre la nucleocápsida y la envuelta naciente durante la morfogénesis del virus (Teng y col., 1998; Ghylidial y col., 2005).

Nucleoproteína (N): Proteína de 391 aa que, junto con el vRNA, forma las ribonucleoproteínas (RNPs) que son el molde funcional para la polimerasa viral. Se localiza junto con las proteínas virales P, 22K y probablemente L, en cuerpos de inclusión citoplasmáticos observados en células infectadas por el VRSH o transfectadas con plásmidos que expresan las proteínas N y P (García y col., 1993).

Fosfoproteína (P): Es una proteína altamente fosforilada en residuos de serina localizados principalmente en el extremo carboxi-terminal de la molécula (Sánchez-Seco y col., 1995) y, en menor medida, en la parte central (Navarro y col.,

1991). Se ha identificado un dominio de oligomerización con un alto contenido en α -hélices en la región central de su estructura primaria (Llorente y col., 2006) y su extremo carboxi-terminal es esencial para la interacción con la proteína N (García-Barreno y col., 1996). La proteína P es un cofactor esencial de la RNA polimerasa de los paramixovirus a la que se han asignado dos funciones principales: (i) interacción de P con moléculas recién sintetizadas de N impidiendo el ensamblaje ilegítimo de la nucleoproteína con moléculas de RNA no virales (Curran y col., 1995; Castagné y col., 2004) y (ii) interacción de P con moléculas N del complejo RNP facilitando la apertura de ese complejo, de manera que la polimerasa viral, asociada a la P, pueda acceder a las bases del RNA (Curran, 1998).

Polimerasa (L): Es la RNA polimerasa dependiente de RNA del virus. Está asociada a la nucleocápsida helicoidal y dirige la síntesis de los mRNA virales, la síntesis del intermediario replicativo de polaridad positiva y la síntesis del vRNA de la progenie viral. Presenta cierta homología de secuencia con las RNA polimerasas de otros paramixovirus y rhabdovirus, especialmente en algunas regiones altamente conservadas que posiblemente correspondan a dominios funcionales de la proteína (Poch y col., 1990; Stec y col., 1991).

Proteína 22K o M2-1: Es exclusiva de la subfamilia *Neumovirinae*. Esta proteína se sintetiza a partir del primer marco de lectura del gen M2 (Collins y col., 1990). Co-localiza con las proteínas N y P en cuerpos de inclusión citoplásmicos (García-Barreno y col., 1996). Es un factor anti-terminador de la transcripción necesario para la formación de mRNA de longitud completa (Collins y col., 1996). Como resultado de esta actividad, la proteína 22K aumenta la frecuencia de mRNA policistrónicos (Hardy y Wertz, 1998; Fearn y Collins, 1999b). Junto con las proteínas P, L, y N, es esencial para el rescate del VRSH a partir de un cDNA clonado (Yu y col., 1995; Collins y col., 1996). El extremo amino-terminal no está expuesto en la forma nativa de la proteína y tiene un papel importante en el plegamiento correcto de esta molécula (García-Barreno y col., 2005).

Proteína M2-2: Se sintetiza a partir del segundo marco abierto de lectura del gen M2 (Collins y Wertz, 1985). Es una proteína pequeña de 9-10 kDa que se encuentra en el citoplasma de células infectadas con el VRSH pero que no se incorpora a los viriones (Ahmadian y col., 1999). Parece actuar como factor regulador implicado en el equilibrio entre la replicación y la transcripción del RNA del virus (Bermingham y Collins, 1999). La proteína M2-2 es dispensable para la viabilidad del VRSH en cultivos celulares, aunque los virus Δ M2-2 muestran un alto grado de atenuación en ratones BALB/c (Bermingham y Collins, 1999).

Proteínas no estructurales NS1 y NS2: Son proteínas de pequeño tamaño que se consideran no estructurales porque no se han encontrado en la partícula viral (Collins y Wertz, 1985; Huang y col., 1985), aunque están presentes en células infectadas. Inhiben la inducción de interferón (IFN) tras la infección de células que presentan esta vía de señalización (Schlender y col., 2000; Valarcher y col., 2003; Spann y col., 2005) y suprimen la maduración de células dendríticas humanas (Munir y col., 2008). En células donde no se produce esta respuesta antiviral, las proteínas NS1 y NS2 no son necesarias para el crecimiento del virus. Ambas proteínas actúan de forma cooperativa, aunque en células infectadas por virus mutantes en los que se ha eliminado una de las dos proteínas, se observa que la NS2 juega un papel primordial en la inhibición del establecimiento del estado antiviral inducido por el interferón (Bossert y col., 2003).

Proteína G: Es una glicoproteína de membrana tipo II que se inserta en la membrana viral por una región cercana a su extremo amino-terminal. No tiene analogía de secuencia ni estructural con la proteína de unión al receptor de otros paramixovirus (Wertz y col., 1985). Se sintetiza como un polipéptido precursor de aproximadamente 300 aminoácidos (dependiendo de la cepa) que es modificado post-traduccionalmente como consecuencia de la adición de carbohidratos, mediante uniones O- y N-glucosídicas, para dar lugar a la proteína madura de 80-90 KDa, estimada por SDS-PAGE (Collins y Mottet, 1992).

La proteína G es considerada la proteína de unión del virus a la célula, puesto que anticuerpos específicos contra esta proteína bloquean esa interacción (Levine y

col., 1987). Hasta el momento no se ha identificado un receptor celular específico para el virus, aunque se sabe que éste se une a la superficie de las células a través de la interacción de la proteína G con glicosaminoglicanos (GAGs) (Hallak y col., 2000; Martínez y Melero, 2000; Techaarpornkul y col., 2002; Escribano-Romero y col., 2004). Sin embargo, se desconoce si ésta es la única interacción del VRSH con la superficie celular antes de que se produzca la fusión de membranas. Se han descrito virus mutantes en los que se ha deleccionado espontáneamente o mediante manipulación genética el gen que codifica para la proteína G y/o SH y son capaces de infectar a las células *in vitro* y de formar sincitios (Karron y col., 1997; Techaarpornkul y col., 2001). Por tanto, la proteína G no es indispensable para la replicación del virus en cultivos celulares, aunque los virus que tienen el gen G deleccionado son altamente atenuados en modelos experimentales *in vivo* (Teng y col., 2001).

La proteína G se expresa en dos formas distintas en la célula infectada: i) como proteína anclada a la membrana (G_m) y ii) como forma soluble (G_s) que se secreta al medio extracelular. El 15-20% de la proteína G que se sintetiza en la célula infectada representa la forma soluble (G_s). Esta forma se produce a partir del mismo mRNA que la forma G_m, como consecuencia del inicio de la traducción en un segundo codón de iniciación, en fase con el primero, lo que elimina los primeros 48 residuos de la proteína asociada a la membrana (G_m) (Roberts y col., 1994). Mientras que la proteína G_m es oligomérica, la proteína G_s es un monómero (Escribano-Romero y col., 2004), equivalente al ectodominio de cada monómero de la proteína G_m. Se ha postulado que la proteína G_s podría capturar anticuerpos neutralizantes impidiendo la neutralización del VRSH y/o podría tener un papel modulador de la respuesta inmune y/o inflamatoria (Polack y col., 2005; Bukreyev y col., 2008).

Esta proteína presenta una alta variabilidad de secuencia entre cepas pertenecientes a distintos grupos antigénicos e incluso entre cepas del mismo grupo (Johnson y col., 1987; García y col., 1994; Martínez y col., 1999). La capacidad de la proteína G de incorporar numerosos cambios en su secuencia se puso de manifiesto en virus mutantes resistentes a la neutralización por determinados anticuerpos monoclonales (García-Barreno y col., 1990; Martínez y col., 1997; Walsh y col.,

1998). Al analizar la secuencia del gen de la proteína G de estos virus, se observaron inserciones y deleciones de adenosinas que originaban cambios en la fase de lectura del gen, dando lugar a cambios drásticos en la secuencia de aminoácidos.

Ensayos realizados en animales de laboratorio indicaron que la proteína G induce anticuerpos neutralizantes. Así, cuando se inmunizaron ratones bien con virus vaccinia recombinantes que expresaban dicha proteína o con proteína G purificada, los ratones quedaron protegidos frente a un desafío con el VRSH (Murphy y col., 1989; Connors y col., 1991). Además, la transferencia pasiva de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína G confirió protección frente a una posterior infección por el VRSH en ratones (Taylor y col., 1984).

Paradójicamente, los anticuerpos monoclonales (AcMs) obtenidos hasta el momento contra la proteína G son débilmente neutralizantes. Sin embargo, sueros policlonales contra la proteína G purificada o mezclas de AcMs anti-G (Martínez y Melero, 1998) o sueros anti-anti-idiotípicos contra AcMs anti-G (Palomo y col., 1990) presentan una mayor capacidad neutralizante. Esto sugiere que la neutralización del VRSH por anticuerpos anti-G implica la unión simultánea de varios anticuerpos a la molécula de proteína G, impidiendo estéricamente la interacción de esta proteína con componentes de la superficie celular

Proteína F: puesto que el objetivo de este trabajo es el estudio de la neutralización por distintos agentes dirigidos contra la proteína de fusión (F) del virus, a continuación se describen con más detalle las características de esta proteína.

1.4. LA PROTEÍNA F

La proteína F de los paramixovirus media la fusión de las membranas viral y celular, permitiendo así la liberación de la nucleocápsida viral en el citoplasma de la célula hospedadora (Srinivasakumar y col., 1991). En etapas posteriores del ciclo infectivo, la proteína F presente en la superficie de la célula infectada promueve la fusión de la membrana de esta célula con la membrana de las células adyacentes,

dando lugar a la formación de grandes células multinucleadas denominadas sincitios (Walsh y Hruska, 1983).

La secuencia de la proteína F del VRSH está altamente conservada en las distintas cepas del virus, tanto del grupo antigénico A como del B (Johnson y Collins, 1988) y comparte características estructurales con las proteínas de fusión de otros paramixovirus, lo que sugiere mecanismos de acción análogos (Lamb y col., 2007).

Al igual que las del resto de paramixovirus, la proteína F del VRSH es un homotrímero (Russell y col., 1994; Calder y col., 2000) que se sintetiza como un precursor inactivo (F0) de 574 aminoácidos (Gruber y Levine, 1983; Collins y col., 1984b; Johnson y Collins, 1988) que es modificado post-traduccionamente en el retículo endoplásmico por la adición de cadenas de azúcares a residuos de asparagina (N-glicosilación). Posteriormente, el precursor F0 es procesado por proteasas celulares tipo furina (Collins y Mottet, 1991; Bolt y col., 2000), dando lugar a dos cadenas, F2 y F1, que se mantienen unidas covalentemente por al menos un puente disulfuro, formado entre los residuos de cisteínas localizados en las posiciones 69 y 212. Se han descrito dos sitios de procesamiento proteolítico ricos en residuos básicos (lisinas y argininas): sitio I (aa106-RARR-109) y sitio II (aa131-KKRKRR-136) (González-Reyes y col., 2001; Zimmer y col., 2001) (Figura 1.5). El doble procesamiento proteolítico es una característica única de la proteína F del VRSH, ya que las proteínas de fusión del resto de paramixovirus solo tienen un único sitio de corte. Mutantes de la proteína F del VRSH con cambios en los sitios I o II son incapaces de inducir la formación de sincitios, indicando que el doble procesamiento proteolítico es necesario para que la proteína F promueva la fusión de membranas (González-Reyes y col., 2001). Estos dos sitios de procesamiento están conservados en todas las cepas del VRSH y del VRS bovino (Zimmer y col., 2001).

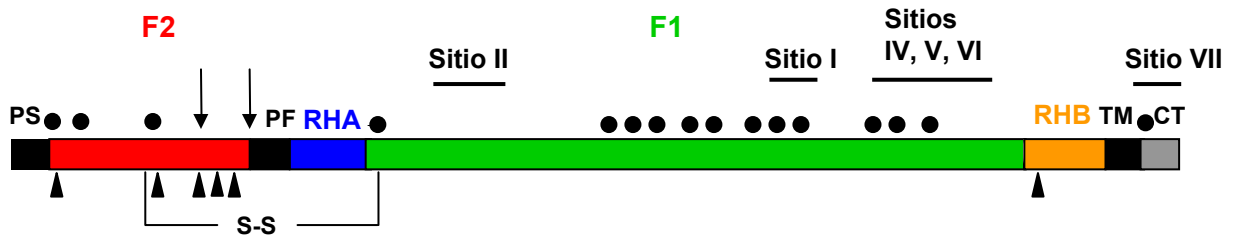


Figura 1.5. Representación esquemática de la proteína F del VRSH. Esquema de la estructura primaria de la proteína F indicando las regiones hidrofóbicas (■): péptido señal (PS), péptido de fusión (PF) y región transmembranal (TM); los sitios de procesamiento proteolítico I y II (▼) que dan lugar a las cadenas F2 y F1; el puente disulfuro entre las dos cadenas (-S-S-); los residuos de cisteínas (●); los sitios potenciales de N-glicosilación (▲); las regiones heptádicas A (RHA, azul) y B (RHB, naranja); la cola citoplasmática (CT) y los sitios antigénicos donde se localizan epítopos reconocidos por AcMs.

Existen tres regiones altamente hidrofóbicas en la proteína F: el **péptido señal** (PS, aminoácidos 1-22), localizado en el extremo N-terminal de la cadena F2 y que no está presente en la proteína madura puesto que se elimina después de su translocación al retículo endoplásmico; el **péptido de fusión** (PF, residuos 137-155) en el extremo N-terminal de la cadena F1 (Scheid y Choppin, 1977) que desempeña un papel fundamental en el proceso de fusión de membranas y la **región transmembranal** (TM), cercana al extremo C-terminal, a través de la cual la proteína se ancla en la membrana del virus y de la célula infectada (Figura 1.5).

En la zona central de la cadena F1 se encuentra una zona que contiene 11 cisteínas muy próximas entre sí. En el extremo C-terminal de esta cadena se localiza la **cola citoplasmática** (CT) de 23 aminoácidos.

Mediante ensayos de reactividad con mutantes que escapan a la neutralización por anticuerpos monoclonales (AcMs), ensayos de competición para la unión simultánea de AcMs al antígeno y ensayos de unión de AcMs a péptidos y/o fragmentos de la proteína F expresados en bacterias se han identificado cinco **sitios antigénicos** que contienen epítopos reconocidos por distintos anticuerpos (Beeler y Van Wyke Coelingh, 1989; García-Barreno y col., 1989; Bourgeois y col., 1991; Arbiza y col., 1992; López y col., 1998). Posteriormente, se identificó un nuevo

epítopo en la cola citoplasmática de la proteína, sitio VII, a la que se une un AcM no neutralizante (97F, C. Palomo, comunicación personal).

Adyacentes al péptido de fusión y a la región transmembranal se encuentran dos regiones heptádicas, **RHA** (aminoácidos 160-207) y **RHB** (aminoácidos 480-516). Se ha demostrado por cristalografía de rayos X que estas dos regiones, expresadas aisladamente, pueden formar un complejo de seis α -hélices altamente estable, donde la primera región heptádica (RHA) forma un trímero de α -hélices enrolladas entre sí, recubierto antiparalelamente por tres α -hélices de la RHB (Zhao y col., 2000, Figura 1.6A). Estudios realizados con péptidos análogos a estas dos regiones heptádicas indicaron que los péptidos de la RHA, forman un complejo trimérico en solución, al que se incorporan los péptidos de la RHB (Lawless-Delmedico y col., 2000; Matthews y col., 2000). Los residuos que contribuyen a la interacción entre las RHAs y las RHBs son hidrofóbicos y están altamente conservados.

Estas regiones heptádicas son motivos estructurales presentes en las proteínas de fusión de todos los paramixovirus (Chambers y col., 1990; Lamb y col., 2007) y de otros virus con envuelta lipídica como la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe, la proteína S de los coronavirus, la proteína GP2 del virus Ébola y la glicoproteína gp41 del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Chan y col., 1997; Skehel y Wiley, 1998; Weissenhorn y col., 1998) (Figura 1.6B). Las regiones heptádicas tienen un papel relevante en la fusión de membranas y contribuyen en gran medida a la estabilidad de la estructura de la proteína F madura. La similitud de estas estructuras en proteínas de fusión tipo I sugiere un mecanismo común de fusión (Baker y col., 1999; Lamb y Jardetzky, 2007; Weissenhorn y col., 2007).

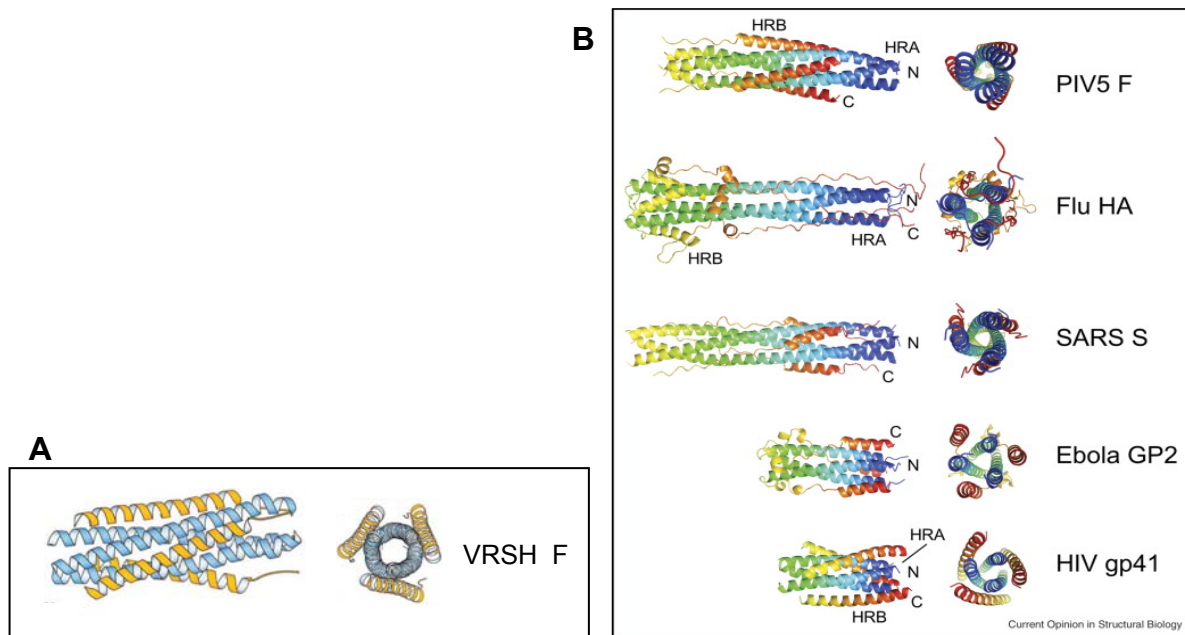


Figura 1.6. Estructura del haz de seis α -hélices de proteínas de fusión viral tipo I. **A:** Las cadenas de la RHA aparecen en azul y las de la HRB en naranja. VRSH: virus respiratorio sincitial humano. Tomado de Zhao y col., 2000. **B:** Las cadenas de la RHA aparecen en azul y las de la HRB en rojo. PIV5: virus de la parainfluenza tipo 5; Flu: virus de la gripe; SARS: virus del síndrome respiratorio agudo severo; HIV: virus de la inmunodeficiencia humana. Tomado de Lamb y Jardetzky, 2007.

Recientemente se han determinado las estructuras atómicas de proteínas F de dos paramixovirus en sus supuestas conformaciones pre-fusión (VPI5) y post-fusión (VPIh3) revelando grandes diferencias estructurales entre ambas conformaciones (Yin y col., 2005, 2006). La estructura casi completa de la proteína F del virus de la parainfluenza humana tipo 3 (VPIh3) (Yin y col., 2005) se obtuvo a partir de una proteína F soluble a la cual se le había cambiado el sitio de procesamiento proteolítico para evitar la activación de la proteína. Sin embargo, la estructura de esta proteína reveló un trímero cuyo tallo estaba formado por un haz de seis α -hélices característico del estado post-fusión altamente estable. Esto sugería la importancia de la región transmembranal, de la que esta proteína carecía, para mantener y estabilizar a la proteína en su conformación metaestable pre-fusión en ausencia de la proteína de unión. Cuando se reemplazó la región transmembranal y la cola citoplasmática de la proteína F del virus de la parainfluenza tipo 5 (VPI5) por un dominio de trimerización (GCN) que estabiliza estructuras α -hélice, se obtuvo una estructura atómica que aparentemente representa la forma pre-fusión de dicha proteína (Yin y col., 2006).

Como se muestra en la Figura 1.7 la estructura pre-fusión que adopta la proteína F del VPI5 tiene forma de seta constituida por una cabeza globular y un tallo formado por tres α -hélices de las RHB de cada uno de los monómeros, orientando la cabeza de la molécula hacia fuera de la membrana viral. La cabeza globular está formada por las cadenas F2 y el resto de las cadenas F1 de los monómeros. Las RHAs se localizan en lo alto de la cabeza, formando una serie de α -hélices cortas unidas por “turns”. El péptido de fusión (PF), localizado hacia la mitad de la cabeza globular, no está expuesto, manteniéndose protegido del solvente. El sitio de procesamiento proteolítico está adyacente al péptido de fusión proyectándose en los vértices del trímero.

La estructura atómica de la proteína F del VPIh3 (Figura 1.7) en su estado post-fusión presenta forma de cono con un tallo constituido por un haz de seis α -hélices en el que las RHAs forman un nucleo de tres α -hélices rodeado por tres α -hélices de forma antiparalela de las RHBs. Este haz de seis α -hélices se encuentra también en la estructura post-fusión de otras proteínas de fusión tipo I y confiere una elevada termoestabilidad a esa estructura (Lamb y Jardetzky, 2007).

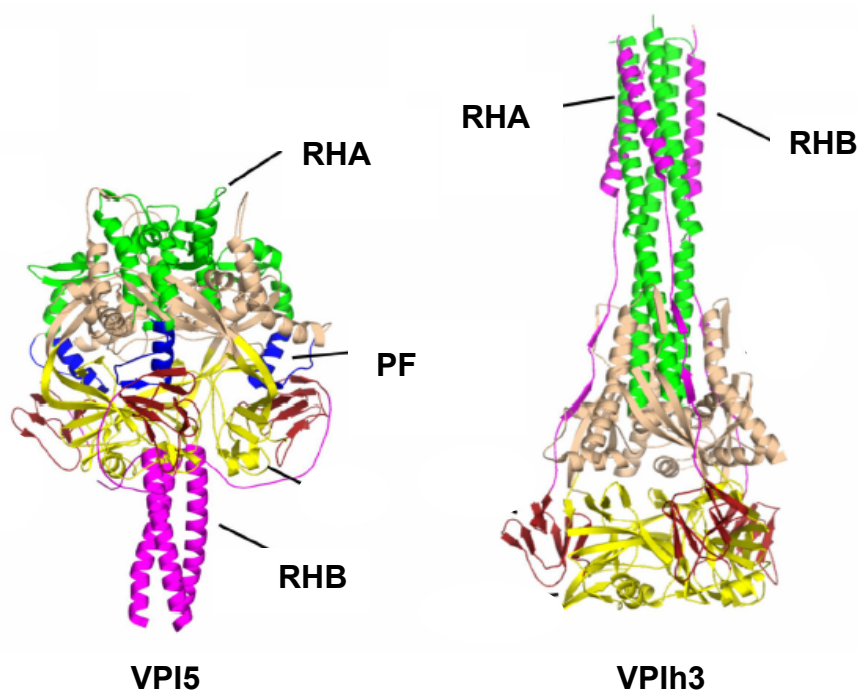


Figura 1.7. Estructura de las proteínas F del VPI5 y VPIh3 en los supuestos estados pre-fusión y post-fusión. Se representa el trímero de las proteínas F del VPI5 (izquierda) y del VPIh3 (derecha), resaltando en ambas las RHAs en verde y las RHBs en rosa. El péptido de fusión (PF) en azul, sólo se resolvió para la proteína F del VPI5. Tomado de Lamb y Jardetzky, 2007.

Hasta el momento no se ha resuelto la estructura atómica de la proteína F completa del VRSH, sólo se dispone de la estructura de seis α -hélices que forman el tallo de la proteína; sin embargo, se han realizado dos modelos bioinformáticos de la estructura tridimensional de la proteína F del VRSH en base a las estructuras atómicas de las proteínas F del VPI5 (pre-fusión) y del VPIh3 (post-fusión) (Figura 1.8, Paulino Gómez-Puertas, comunicación personal). En el modelo correspondiente al estado pre-fusión de la proteína F (Figura 1.8A) se indican con flechas los dos sitios de procesamiento proteolítico únicos del VRSH.

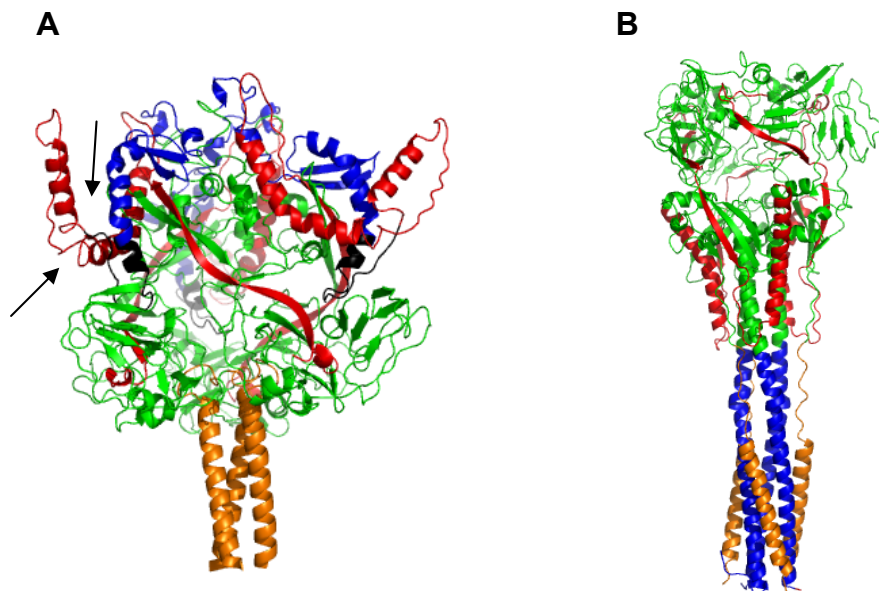


Figura 1.8. Modelos de la estructura tridimensional de la proteína F del VRSH en sus formas pre- y post-fusión. Estos modelos se construyeron en base a las estructuras atómicas de las proteínas F del VPI5 para el modelo pre-fusión (A) y del VPIh3 para el modelo post-fusión (B). En el modelo pre-fusión (A) se indican con flechas los dos sitios de procesamiento proteolítico. La cadena F2 se representa en rojo y las distintas regiones de la cadena F1 en los siguientes colores: negro, péptido de fusión (PF); azul, RHA; naranja, RHB; verde, resto de la cadena F1. (Paulino Gómez-Puertas, comunicación personal).

Con el objeto de facilitar la purificación de la proteína F, en el trabajo que se presenta en esta Tesis se ha empleado un virus vaccinia recombinante (VAC/ F_{TM-}) en el que se ha insertado el gen de la proteína F modificado para producir una forma soluble de la misma (F_{TM-}) (Figura 1.9A). Este mutante carece de los últimos 50 aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína F, que incluyen la cola

citoplasmática (CT) y la región transmembranal (TM). Por tanto, la proteína F_{TM-} se secreta al sobrenadante de células infectadas con el virus VAC/ F_{TM-} , de donde se puede purificar en ausencia de detergentes. Cuando la proteína F_{TM-} purificada se observa al microscopio electrónico mediante tinción negativa, aparecen moléculas individuales con forma de cono (Figura 1.9B). Mediante el tratamiento informático de dichas micrografías se hizo una reconstrucción tridimensional (Figura 1.9C, Jaime Martín-Benito, comunicación personal) de la proteína F_{TM-} . Esa reconstrucción generaba una molécula en forma de cono que se asemeja al modelo bioinformático mencionado anteriormente para el estado post-fusión de la proteína F del VRSH (Figura 1.9D, Paulino Gómez-Puertas, comunicación personal). Como se mencionó anteriormente para la estructura de la proteína post-fusión de VPIh3, el tallo de la proteína F_{TM-} estaría formado por un haz de seis α -hélices constituido por las RHAs y RHBs (Calder y col., 2000). Este hecho, junto con su elevada termoestabilidad (Ruiz-Argüello y col., 2004), sugieren que la proteína soluble F_{TM-} adopta la conformación post-fusión de la proteína F del VRSH.

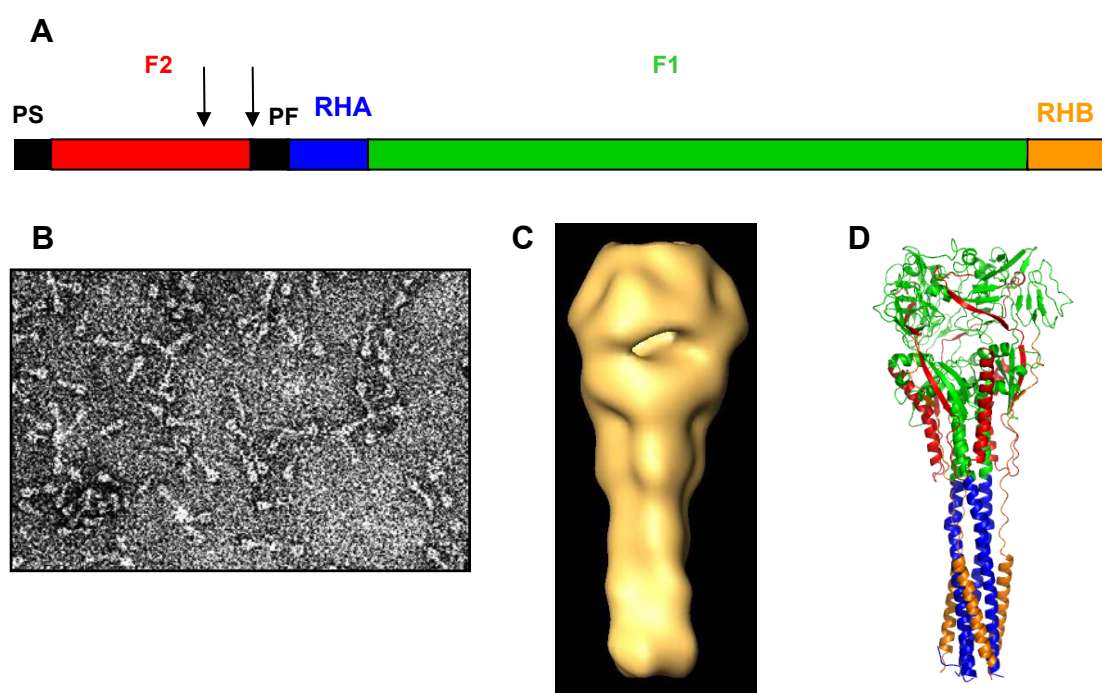


Figura 1.9. Estructura de la proteína F_{TM-} : **A**, Estructura primaria de la proteína F_{TM-} (forma mutante obtenida al introducir un codón stop tras la RHB para eliminar la región transmembranal y citoplasmática). **B**, Micrografías obtenidas al microscopio electrónico de preparaciones de proteína F_{TM-} purificada. **C**, Reconstrucción 3D de la proteína F_{TM-} (Jaime Martín-Benito, comunicación personal) **D**, Modelo bioinformático del ectodominio de la proteína F en base a la estructura atómica de la proteína F del VPIh3 (Yin y col., 2005) (P. Gómez-Puertas, comunicación personal). Se representa con los mismos colores que en la estructura primaria de la proteína F (A).

En las preparaciones de proteína F_{TM-} purificada, la mayoría de las moléculas (~80%) están en forma de conos individuales, mientras que el resto de moléculas aparecen agregadas en rosetas (Calder y col., 2000). Al analizar por SDS-PAGE preparaciones de la proteína F_{TM-} purificada se observó que no todos los monómeros de la proteína F_{TM-} estaban procesados en los sitios I y II. Así, además de la banda que corresponde a la cadena F1 procesada en el sitio II, aparecían también bandas minoritarias que correspondían a monómeros no procesados (F0) o a monómeros procesados sólo en el sitio de corte I ($F_{\Delta 1-109}$). La digestión suave con tripsina de estas preparaciones de proteína F_{TM-} completó el procesamiento de todos los monómeros en los sitios de corte I y II y, al mismo tiempo, se observó por microscopía electrónica el cambio de conos individuales a agregados en forma de rosetas (González-Reyes y col., 2001). Esta agregación de la proteína F_{TM-} no ocurría cuando se utilizaban proteínas mutantes que tenían cambiados los aminoácidos de los sitios de corte I y II (Ruiz-Argüello y col., 2002). Por todo esto, se propuso que el doble procesamiento proteolítico de los monómeros de la proteína F_{TM-} induce un cambio conformacional en la molécula que expone el péptido de fusión al solvente acuoso y conduce a la agregación de la proteína F_{TM-} por interacciones de los péptidos de fusión de varias moléculas (Ruiz-Argüello y col., 2004).

Por tanto, y para evitar la agregación de la proteína F_{TM-} que podría ocurrir si los monómeros de esta proteína se procesasen espontáneamente (cosa que ocurre al almacenarse prolongadamente la proteína F_{TM-} purificada), en este trabajo también se ha empleado otra forma mutante de la proteína F, denominada $F_{TM-/NN}$. Esta proteína, como la F_{TM-} , carece de las regiones transmembranal y citoplasmática y tiene cambiados los residuos básicos de lisinas (K) y argininas (R), de los sitios de corte I y II, por asparaginas (N), para evitar su procesamiento proteolítico y su consecuente agregación.

1.5. PROCESO DE FUSIÓN DE MEMBRANAS

La entrada del VRSH en la célula requiere, al igual que en otros paramixovirus, la fusión de la membrana del virus con la de la célula diana, proceso mediado por la proteína F (Lamb, 1993; Hernández y col., 1996; Chan y Kim, 1998; Weissenhorn y col., 1999; Russell y Luque, 2006).

Se ha propuesto un modelo del mecanismo de fusión de membranas mediado por la proteína F de los paramixovirus (Yin y col., 2006), basándose en las estructuras atómicas de la proteína F, en los estados pre- y post-fusión, que se disponen hasta el momento (Figura 1.10). Según este modelo, la proteína F se encuentra en la membrana viral en un estado pre-activo metaestable. Tras la unión del virus a la célula diana, la proteína F debe activarse para que se inicie el proceso de fusión de membranas. Esta activación implicaría el inicio de una serie de cambios conformacionales en la proteína F, que incluirían la exposición del péptido de fusión para su inserción en la membrana de la célula y la consiguiente formación de un intermedio estructural denominado “pre-hairpin”. El replegamiento posterior de este intermedio inestable conduciría a la formación de una estructura muy estable (6HB, *six helix bundle*), debido a la interacción de las α -hélices formadas por las RHAs y RHBs, lo que conduciría al acercamiento de las dos membranas y a la formación del poro de fusión. La energía liberada al pasar la proteína F de una forma menos estable (pre-fusión) a otra más estable (post-fusión) favorecería el proceso de fusión de las dos membranas de forma irreversible.

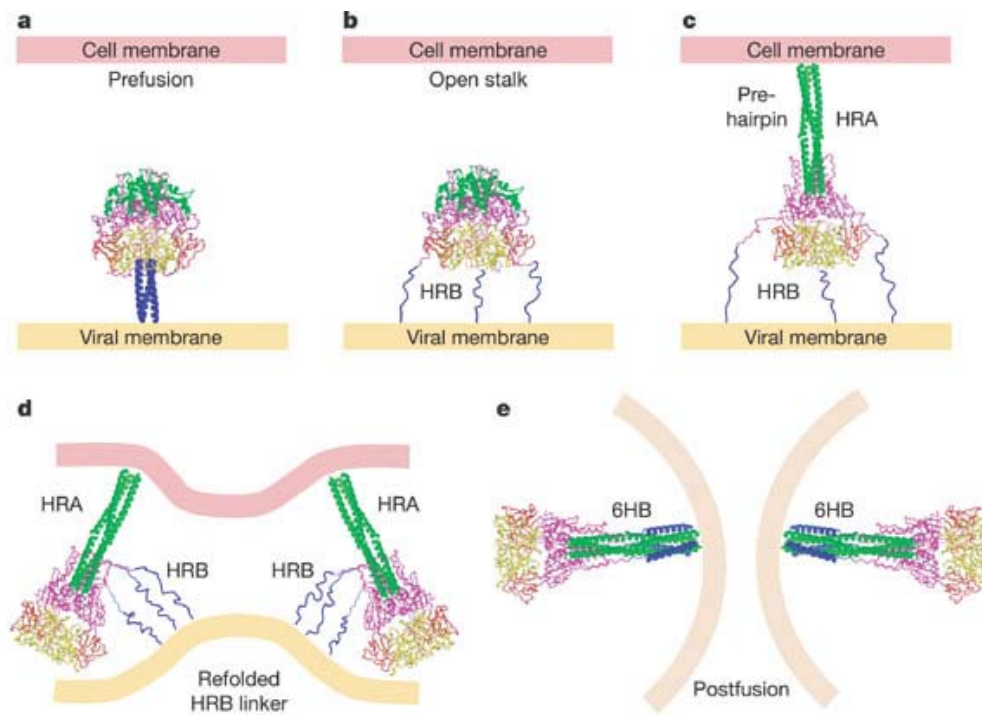


Figura 1.10. Representación esquemática del modelo de fusión de membranas mediado por paramixovirus. (a) Solo se muestra una de las moléculas de proteína F anclada en la membrana viral en un estado metaestable; (b) tras su activación, las cadenas de la HRB se separan y el péptido de fusión se expone; (c) el péptido de fusión se inserta en la membrana de la célula diana y la HRA adopta una estructura de α -hélice; (d) tras el replegamiento del intermedio inestable "pre-hairpin" las membranas viral y celular se acercan; (e) se produce el intercambio de lípidos entre las dos membranas y se forma el poro de fusión. La proteína F queda en un estado post-fusión altamente estable cuyo tallo está formado por un haz de seis α -hélices. Tomado de Yin y col., 2006.

En la mayoría de los paramixovirus, el mecanismo de activación de la proteína F procesada proteolíticamente parece implicar la interacción de la proteína de unión al receptor (HN o H) con su ligando. Esta interacción induciría cambios conformacionales en la proteína de unión al receptor que, de alguna forma, se transmitirían a la proteína F, activándola para la fusión de membranas.

La obtención del ectodominio de la proteína F del VPI5 en forma soluble y en su conformación pre-fusión ha permitido realizar experimentos que mimetizan artificialmente la transición natural de la proteína del estado pre-fusión al post-fusión durante la fusión de membranas (Connolly y col., 2006). En estos experimentos se observó que la digestión con tripsina de esa forma de la proteína F del VPI5 (Figura 1.11, lado izquierdo) inducía cambios conformacionales locales, detectados por diferencias de reactividad con AcMs, pero que eran insuficientes para promover la exposición del péptido de fusión y su asociación con liposomas. Solo se observó una asociación a liposomas cuando la proteína proteolíticamente procesada se

incubó a altas temperaturas, lo que sugiere que el cambio conformacional necesario para que se produzca la exposición del péptido de fusión y los cambios conformacionales subsiguientes requieren energía. Por otra parte, se observó al microscopio electrónico que si se incubaba a altas temperaturas la forma soluble de la proteína F del VPI5 en su estado pre-fusión pero no procesada proteolíticamente, la proteína adoptaba una forma muy parecida a la conformación post-fusión (Figura 1.11, lado derecho) pero no se asociaba a liposomas. Esto solamente ocurría cuando la proteína calentada se digería con tripsina. Esto apoya el modelo según el cual para que se produzca la fusión de membranas existen dos requerimientos: que la proteína F esté procesada proteolíticamente y además sufra un cambio conformacional. Ya que la proteína F de los paramixovirus requiere la presencia de la proteína de unión al receptor para la fusión de membranas, esta proteína podría ser la responsable de inducir ese cambio conformacional, activando a la proteína F para iniciar la fusión de membranas.

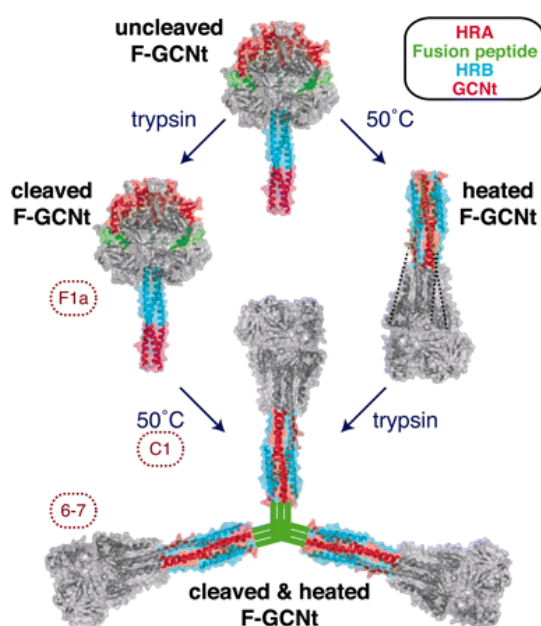


Figura 1.11. Representación esquemática de la transición de la conformación pre-fusión a la post-fusión de la proteína F de VPI5. Cuando la proteína F-GCN (pre-fusión) se trata primero con tripsina (lado izquierdo de la Figura) se producen cambios en la reactividad con algún anticuerpo pero la proteína no cambia de conformación. Sin embargo, si posteriormente se calienta a 50°C, se produce un cambio conformacional pasando a adoptar la estructura post-fusión y se produce la agregación en rosetas a través de los péptidos de fusión. Cuando la proteína F-GCN (pre-fusión) se calienta primero a 50°C en ausencia de tripsina, adquiere la conformación post-fusión no procesada. Si ésta se trata con tripsina se agrega en rosetas. Tomado de Connolly y col., 2006.

Sin embargo, el VRSH y el metaneumovirus humano (MNVH) pertenecientes a la subfamilia *Neumovirinae* no requieren la presencia de la proteína de unión (G) para infectar células en cultivo, ya que como se ha mencionado anteriormente, virus mutantes que carecen de la proteína G son capaces de replicar *in vitro* (Karron y col., 1997; Techaarpornkul y col., 2001; Biacchesi y col., 2004, 2005). Por tanto, debe existir un mecanismo de activación de la proteína F diferente sin la participación de la proteína G. En el MNVH se ha propuesto que la interacción de la proteína F por su dominio Arg-Gly-Asp (RGD) con integrinas de la célula puede provocar un cambio conformacional en la proteína F necesario para que se produzca la fusión de membranas (Cseke y col., 2009). Quizá en el VRSH, el requerimiento del doble procesamiento proteolítico de la proteína F sea un mecanismo que regule la activación de la proteína F para fusionar membranas (Rawling y col., 2008).

1.6. RESPUESTA INMUNE FRENTE AL VRSH

El sistema inmunológico juega un papel determinante en la protección y en la recuperación de la infección por el VRSH (Crowe, 1999). Mientras que los anticuerpos neutralizantes desempeñan un papel primordial en la protección frente al VRSH, la respuesta celular tiene un papel significativo en la memoria inmunológica y en la respuesta inmunopatológica. En adultos inmunodeprimidos, el VRSH constituye una causa seria de infección respiratoria incluso pudiendo progresar hasta la muerte (Hall y col., 1986; Ghosh y col., 2000). Tras la infección de células diana por el VRSH (principalmente células epiteliales del tracto respiratorio, pero también macrófagos y células dendríticas) se induce la producción local de citoquinas y quimioquinas que dan lugar a una respuesta inflamatoria. Esta respuesta juega un papel fundamental en la patología asociada a la infección por el VRSH.

1.6.1. Respuesta humoral

Los anticuerpos juegan un papel decisivo en la protección frente a la infección por el VRSH (Alwan y col., 1993). Tanto en modelos animales como en humanos se observa una correlación entre los niveles de anticuerpos neutralizantes presentes en el suero y los niveles de protección frente a un desafío con el VRSH (Watt y col., 1990; Hall y col., 1991). Además, estudios en modelos animales han demostrado que la transferencia pasiva de anticuerpos policlonales neutralizantes a ratones o a “cotton rats” (*Sigmodon hispidus*) confiere protección frente al VRSH; lo que indica que esos anticuerpos por si solos, sin la participación de células efectoras (linfocitos T citotóxicos, células NK, etc.) son capaces de conferir protección (Prince y col., 1987). La inmunización de animales con virus vaccinia recombinantes que expresaban proteínas individuales del VRSH, puso de manifiesto que las únicas proteínas capaces de inducir anticuerpos neutralizantes son las glicoproteínas de membrana F y G (Olmsted y col., 1986; Stott y col., 1987; Wertz y col., 1987; Connors y col., 1991). El mismo resultado se obtuvo con anticuerpos monoclonales dirigidos contra las proteínas F y G. Así, la administración pasiva de esos anticuerpos a animales de experimentación produjo protección frente a una infección experimental posterior por el virus (Taylor y col., 1984). Incluso fragmentos Fab de esos AcMs protegieron frente a la infección por el VRSH, indicando que dicha protección no depende ni de la bivalencia ni de la activación del complemento (Prince y col., 1990).

Los datos que se disponen de ensayos en humanos corroboran los resultados obtenidos en modelos animales. Los anticuerpos neutralizantes que se inducen tras la infección natural por el VRSH están dirigidos exclusivamente frente a las proteínas F y G, puesto que al eliminar de preparaciones de inmunoglobulinas humanas los anticuerpos dirigidos contra esas proteínas, se elimina su capacidad neutralizante (Sastre y col., 2005).

En el suero de niños recién nacidos hay anticuerpos neutralizantes maternos frente al VRSH transferidos a través de la placenta (Parrott y col., 1973; Glezen y col., 1986). Éstos son responsables de que los niños estén protegidos frente a una infección grave producida por el virus durante aproximadamente los dos primeros meses de vida. Pasado este tiempo los niveles de anticuerpos maternos van

disminuyendo, y es entre los 2 y 6 meses de vida cuando los niños son más susceptibles de infectarse por el virus. En estos niños los niveles de anticuerpos producidos después de una infección natural no son muy elevados, debido probablemente a la falta de madurez del sistema inmune (Murphy y col., 1986). A medida que los niños van creciendo se producen múltiples reinfecciones y los niveles de IgG e IgA dirigidos contra las proteína F y G van aumentando (Henderson y col., 1979b).

Además de las inmunoglobulinas de tipo G (IgG) circulantes en el suero, la respuesta inmunitaria tipo IgA en las mucosas y el lumen respiratorio constituye un papel protector importante ante las reinfecciones (Freiherst y Ogra, 2001; Pilette y col., 2001). Estudios realizados en animales y en humanos han demostrado que existe una relación directa entre los niveles de IgA específicos contra el VRSH en el tracto respiratorio y los niveles de protección. Sin embargo, debido a la corta vida media de los anticuerpos IgA, la protección mediada por éstos es de menor duración que la proporcionada por las IgG (Singleton y col., 2003).

Como consecuencia de todos estos estudios (animales y humanos) se empezó a utilizar como medida profiláctica en pacientes con un alto riesgo de sufrir una infección por el VRSH, Respigam®, una preparación de inmunoglobulinas humanas purificadas a partir de plasmas con altos títulos de anticuerpos neutralizantes frente al VRSH. Los ensayos clínicos llevados a cabo con el Respigam® confirmaron, a su vez, que la transmisión pasiva de anticuerpos neutralizantes es capaz de conferir protección, como se había visto en animales. Posteriormente, se desarrolló como alternativa el Synagis®, un AcM humanizado que reconoce la proteína F del VRSH.

Todo esto pone de manifiesto el papel crítico que juegan los anticuerpos neutralizantes en la protección frente a infecciones por el VRSH. Estos resultados han de tenerse en cuenta a la hora de diseñar una vacuna eficaz frente al VRSH. Ésta debe ser capaz de inducir eficazmente una respuesta de anticuerpos neutralizantes incluso en presencia de anticuerpos maternos que puedan tener un efecto supresor frente a la vacuna.

1.6.2. Respuesta celular

Resultados obtenidos tras la eliminación de linfocitos B en ratones mediante el tratamiento con un anticuerpo anti- μ , demostraron que los anticuerpos específicos contra el VRSH son fundamentales para proporcionar protección frente a una infección por el virus, sin embargo, no son necesarios para eliminarlo (Graham y col., 1991a). Por otra parte se ha demostrado en un modelo animal que los linfocitos T CD8⁺ juegan un papel tanto en la eliminación del virus como en la patología pulmonar (Cannon y col. 1988; Graham y col. 1991a). Estudios en ratones a los que se les han eliminado los linfocitos T CD4⁺ y/o T CD8⁺ mediante el tratamiento con anticuerpos específicos contra cada uno de los dos tipos de células, pusieron de manifiesto la implicación de ambos tipos de linfocitos en la eliminación del virus tras una infección (Graham y col., 1991b). Si los ratones deplecionados se volvían a reconstituir con células T, se generaba de nuevo una respuesta inmune eficaz. La situación en humanos es similar, de manera que los niños inmunodeprimidos tardan más tiempo en eliminar el virus que los niños sanos (Hall y col., 1986; Chandwani y col., 1990).

Además de participar en la eliminación del virus, las células T están implicadas en el aumento de la severidad de la patología producida como consecuencia de la infección por el VRSH (Kapikian y col., 1969; Kim y col., 1969). Los linfocitos T *helper* (CD4⁺), concretamente los Th2, son los principales responsables de esta situación. Tras reconocer a uno o varios epítopos en la proteína G del VRSH se producen altos niveles de IL-4 e IL-5 que inducen la migración masiva de eosinófilos hacia los pulmones aumentando la severidad de la enfermedad (Openshaw y col., 1992; Sparer y col., 1998).

Además, la infección con el VRSH altera la actividad efectora y de memoria de linfocitos T CD8⁺ selectivamente en los pulmones (Chang y col., 2001; Chang y Braciale, 2002). Se ha sugerido que esta desregulación inmune de los linfocitos T CD8⁺ específicos del virus inducida por el VRSH (Chang y Braciale., 2002) junto con la variabilidad antigénica, sobre todo de la proteína G (Wright y col., 2000), así como la falta de una respuesta inmune completa por parte de los linfocitos T de memoria (Connors y col., 1991) y la corta vida media de los anticuerpos IgA presentes en las

mucosas del tejido epitelial del tracto respiratorio (Singleton y col., 2003) podría ser el origen de las múltiples reinfecciones que se producen a lo largo de la vida del individuo.

Por todo lo que se ha dicho hasta el momento es evidente la importancia de la participación de ambos tipos de respuesta inmune, humoral y celular, en la protección y en la recuperación frente a la infección por el VRSH.

1.7. MECANISMOS DE NEUTRALIZACIÓN DE VIRUS POR ANTICUERPOS

Como se ha mencionado anteriormente, los anticuerpos juegan un papel fundamental en la protección frente al VRSH, al igual que ocurre en otros virus. Una visión general de los mecanismos por los cuales los anticuerpos son capaces de inhibir la infectividad viral puede aportar información sobre el desarrollo de futuras medidas profilácticas o terapéuticas frente al VRSH. Algunos de estos mecanismos se indican a continuación:

1) Agregación de partículas virales: La capacidad de un anticuerpo bivalente de unirse al antígeno presente en la superficie de distintos viriones conduce a la agregación de las partículas virales y a la reducción de virus capaces de iniciar el ciclo infectivo. Esta reducción es directamente proporcional al número de partículas virales agregadas y depende de la flexibilidad de la región bisagra determinada por el isotipo del anticuerpo (Brioen y col., 1983; Thomas y col., 1985, 1986).

2) Desestabilización de la estructura del virión: En algunos virus sin envuelta, tales como virus de la familia picornairidae, la unión del virus al receptor celular provoca una desorganización de la estructura de la cápsida necesaria para que se libere el genoma viral al interior de la célula diana. Existen anticuerpos que actúan mimetizando al receptor celular y por tanto su unión a los viriones provoca una desorganización de la cápside viral y la liberación prematura del genoma viral al medio extracelular (McCullough y col., 1987).

3) Inhibición de la unión del virus a la célula: La primera etapa del ciclo infectivo implica la unión del virus a la célula. En virus con envuelta esa interacción está mediada por la unión de proteínas de la membrana viral con receptores celulares. Anticuerpos dirigidos contra proteínas de unión al receptor de distintos virus tales como, la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe (Knossow y col., 2002), la glicoproteína gp120 del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Posner y col., 1991) o la proteína E de Filovirus (He y col., 1995; Crill y Roehring, 2001; Nybakken y col., 2005) inhiben esta unión de forma directa al bloquear estéricamente la unión de las proteínas respectivas a sus receptores. También mezclas de AcMs dirigidos contra la proteína G del VRSV (Martínez y Melero, 1998) o AcMs específicos de la proteína HN del virus de la enfermedad de Newcastle (Iorio y Bratt, 1984) neutralizan la infectividad viral, inhibiendo estéricamente la unión de esas proteínas a la superficie celular.

4) Inhibición de la fusión de las membranas viral y celular: Los virus con envuelta entran en la célula diana por la fusión de su membrana con membranas de la célula. Dicho proceso está mediado por alguna de las proteínas de la envuelta. La unión de anticuerpos neutralizantes a esas proteínas impide que se produzca la fusión de las membranas viral y celular, pudiendo inhibir este proceso en distintas etapas del mismo. Así, en el caso del virus de la gripe se sabe que la activación de la hemaglutinina (HA) del virus se produce tras la exposición al pH ácido de las vesículas endocíticas. Se ha descrito un AcM anti-HA que bloquea los cambios conformacionales que experimenta la hemaglutinina de la gripe tras la exposición a pH bajo y que son requeridos para que se produzca la fusión de membranas (Barbey-Martin y col., 2002). Es decir, en este caso el AcM inhibe aparentemente la activación de la HA.

En el caso del VIH, la unión a receptores y co-receptores celulares de la glicoproteína gp120 activa el proceso de fusión de membranas, de manera que se exponen ciertos epítopos en esa molécula que previamente estaban ocultos. El AcM neutralizante 17b reconoce un epítipo de la cadena gp120 sólo cuando ha tenido lugar la unión de ésta al receptor celular CD4 (Thali y col., 1993). Por tanto, este

anticuerpo parece inhibir el proceso de fusión de membranas en una etapa posterior a la activación de la glicoproteína gp120.

Como se mostrará en este trabajo, el proceso de fusión de membranas mediado por la proteína F del VRSH puede ser inhibido por distintos agentes (AcMs, péptidos, compuestos de bajo peso molecular) que reconocen y bloquean conformaciones distintas de la proteína F produciendo la neutralización de la infectividad viral.

5) Inhibición de eventos post-entrada del virus a la célula: La unión de anticuerpos a proteínas de la superficie del virión puede producir la pérdida de la infectividad viral por distintos mecanismos una vez que el virus ha entrado en la célula:

- Inhibición de la desencapsidación del virus: AcMs dirigidos contra la proteína hexón de la cápsida del adenovirus inhiben la desencapsidación del virus y la entrada del DNA viral al núcleo; sin embargo, no inhiben la entrada del virus a la célula ni su transporte intracelular al espacio perinuclear (Varghese y col., 2004).
- Inhibición del ensamblaje y liberación de la progenie viral: AcMs dirigidos contra la neuraminidasa (NA) y la proteína M2 del virus de la gripe impiden la liberación de viriones de la célula infectada (Webster y col., 1967; Zebedee y col., 1988).

1.8. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO

Como se ha mencionado anteriormente, la proteína F del VRSH es una de las principales candidatas en la elaboración de medidas profilácticas y terapéuticas ya que es una diana antigénica importante para anticuerpos neutralizantes.

Actualmente no se dispone de ninguna vacuna para prevenir la infección por el VRSH. En la década de los 60 se llevó a cabo una prueba de vacunación en niños seronegativos con preparaciones de virus inactivado con formalina. Los niños

vacunados, sin embargo, no quedaron protegidos frente a una posterior infección natural por el virus y, además, desarrollaron frecuentemente una enfermedad más grave tras la infección por el VRSH que el grupo de niños control (Kapikian y col., 1969; Kim y col., 1969).

Ensayos realizados en ratones, han demostrado que una vacuna de virus inactivado produce una respuesta no protectora, probablemente por una falta de maduración de la respuesta inmune frente al virus. Además, se producen altos niveles de anticuerpos que forman complejos inmunes con el virus que se depositan en los pulmones, lo que puede contribuir a agravar la enfermedad. En cambio, cuando se emplea una vacuna de virus atenuado, la respuesta inmune sí madura y se forman anticuerpos capaces de neutralizar al virus (Delgado y col., 2009).

Ante la ausencia de una vacuna, se ha utilizado como inmunoprofilaxis pasiva, la administración de anticuerpos policlonales o monoclonales. Como se dijo anteriormente, en primer lugar se usaron preparaciones de inmunoglobulinas humanas (Respigam®), obtenidas a partir del plasma de individuos sanos seleccionados por su alta capacidad neutralizante contra el VRSH (Siber y col., 1992; Groothuis y col., 1993). Estas inmunoglobulinas conferían cierta protección de manera que se reducía la gravedad de la enfermedad así como la frecuencia y duración de la hospitalización. Más tarde, Respigam® fue sustituido por Synagis®, un anticuerpo monoclonal neutralizante dirigido contra la proteína F, el cual se humanizó manteniendo los CDRs del anticuerpo murino (Johnson y col., 1997). El Synagis® ha resultado ser 50-100 veces más eficaz que el RespiGam®, como se ha comprobado mediante ensayos de neutralización y de inhibición de fusión (Johnson y col., 1999), presentando además las ventajas de que la cantidad requerida de anticuerpo es menor y la vía de administración es intramuscular, en lugar de intravenosa como se hacía con RespiGam®. Este tratamiento profiláctico se usa en la actualidad en niños pertenecientes a grupos de alto riesgo (niños prematuros o con displasia broncopulmonar) (Groothuis y Nishida, 2002; Cárdenas y col., 2005; Null y col., 2005) así como en pacientes con trasplante de médula ósea (Boeckh y col., 2001).

Como tratamiento terapéutico de la infección por el VRSH se empezó a utilizar hace años un antiviral de amplio espectro, ribavirina (Hruska y col., 1980). Los

primeros ensayos indicaron una disminución en la diseminación del virus así como de los síntomas clínicos: frecuencia de mortalidad, tiempo de hospitalización o necesidad de cuidados intensivos (American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases, 1996; Mills, 1999). Sin embargo, estudios posteriores pusieron en duda su eficacia (Ohmit y col., 1996). Esto, junto con la dificultad de su administración en aerosol, las cantidades tan grandes requeridas y el alto coste, hizo que la ribavirina se dejara de emplear en la práctica clínica.

Se han sintetizado una gran variedad de compuestos químicos con propiedades antivirales frente al VRSH que se encuentran en fase de desarrollo clínico (Huntley y col., 2002; Cianci y col., 2004a,c; Douglas y col., 2005). Algunos de ellos, inhiben la actividad de la proteína de fusión del VRSH; por ejemplo, el compuesto de bajo peso molecular BMS-433771 interacciona con dominios hidrofóbicos de la región heptádica A (RHA) de la proteína F impidiendo así probablemente la formación del haz de seis α -hélices, necesario para que se produzca la fusión de membranas (Figura 1.10) (Cianci y col., 2004b). Por otra parte, se ha descrito que péptidos sintéticos que contienen secuencias correspondientes a la RHB de la proteína F del VRSH inhiben la fusión (Lambert y col., 1996). Estos péptidos actúan también probablemente uniéndose a la RHA expuesta en la estructura intermedia de “pre-hairpin”, durante el proceso de fusión de membranas (Figura 1.10) e inhibiendo su posterior replegamiento en la estructura post-fusión donde el tallo está formado por un haz de seis α -hélices (6HB, *six helix bundle*). Péptidos con características similares se han descrito para las glicoproteínas de otros virus con envuelta y algunos han llegado a tener una aplicación en la clínica. Así, en el año 2003, la FDA aprobó como tratamiento antirretroviral contra el VIH un compuesto que inhibe la entrada del virus a la célula denominado enfuvirtide o T-20 (Hardy y col., 2004). Se trata de un péptido que contiene secuencias de la RHB de la cadena gp41 de la glicoproteína de superficie gp160. Su mecanismo de acción es análogo al propuesto para los péptidos de la RHB del VRSH.

Todo lo que se ha dicho hasta el momento, pone de manifiesto la relevancia del estudio de los mecanismos de neutralización del VRSH por diversos compuestos y especialmente por los anticuerpos ya que juegan un papel primordial en la protección frente a la infección por este virus. Asimismo, los avances en el

conocimiento de la proteína F como principal antígeno inductor de anticuerpos neutralizantes y de las distintas formas que adopta la proteína F durante el proceso de fusión de membranas, podrían ser aplicados al desarrollo de una posible vacuna y a diseccionar las etapas de la transición de la forma pre-fusión a la post-fusión que pueden ser bloqueadas en este proceso, clave en el ciclo vital del VRSH.

2. OBJETIVOS

Como se ha mencionado en la Introducción, la fusión de membranas mediada por la proteína F es una etapa fundamental del ciclo infectivo del virus respiratorio sincitial humano (VRSH). La proteína F junto con la proteína G son las únicas capaces de inducir anticuerpos neutralizantes en animales de experimentación y en humanos.

Dada la importancia del papel que juegan los anticuerpos dirigidos contra la proteína F en la protección frente a la infección por el virus, el conocimiento de los mecanismos por los que distintos agentes inhiben la funcionalidad de esta proteína es esencial para el desarrollo de futuras medidas profilácticas y/o terapéuticas ante la infección por el VRSH.

Por todo ello, nos planteamos los siguientes objetivos:

- Comparar la capacidad neutralizante de AcMs y fragmentos Fab que reconocen epítomos localizados en distintos sitios antigénicos de la proteína F atendiendo a la influencia de la bivalencia del anticuerpo y a la afinidad por el antígeno.
- Identificar las etapas del proceso de fusión de membranas que son inhibidas por anticuerpos neutralizantes y otros agentes.
- Reproducir en modelos animales la respuesta humoral inducida tras la infección natural por el VRSH en humanos, que conduce a la producción de anticuerpos que reconocen distintas conformaciones de la proteína F.
- Purificar y caracterizar los anticuerpos mencionados en el punto anterior y, consecuentemente, avanzar en la caracterización de las distintas conformaciones que puede adoptar la proteína F del VRSH.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1.1. Líneas celulares

- HEp-2: carcinoma de laringe humano, American Type Culture Collection, ATCC:CCL-23.
- CV-1: células de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), American Type Culture Collection (ATCC:CCL-70).
- BHK-21: células de riñón de hámster sirio o dorado (*Mesocricetus auratus*), American Type Culture Collection (ATCC:CCL-10).
- BSR T7/5: línea celular derivada de BHK-21 que expresa la RNA polimerasa del bacteriófago T7(Buchholz y col.,1999).
- Hibridomas productores de anticuerpos generados en el laboratorio.

3.1.1.2. Virus

- **Virus respiratorio sincitial humano (VRSH)** cepa **Long**, perteneciente al grupo antigénico A, aislada en Baltimore (Estados Unidos) en 1956.
- Virus vaccinia recombinantes **VAC/F_C**, **VAC/F_{TM}⁻**, **VAC/F_{TM}⁻/NN** y **VAC/P** generados en el laboratorio, que expresan la proteína F completa, la F_{TM}⁻ (forma mutante que carece de los últimos 50 aminoácidos de la región carboxi-terminal, correspondientes a la cola citoplasmática y la región transmembranal), la F_{TM}⁻/NN (proteína F_{TM}⁻ que tiene cambiados los aminoácidos básicos de los sitios de procesamiento proteolítico por asparaginas) y la P (fosfoproteína) del VRSH, respectivamente (Bembridge y col., 1999).

3.1.1.3. Bacterias y plásmidos

La cepa bacteriana utilizada para el crecimiento de los plásmidos que se han empleado en el trabajo ha sido *Escherichia coli* DH5 α (Hanahn, 1983).

Los plásmidos empleados para el desarrollo del trabajo se resumen en la siguiente tabla:

PLÁSMIDO	TAMAÑO(pb)	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
pTM1	5357	Amp ^r , líder EMC, pT7, tT7	Moss y col., 1990
pTM1/F	7253	Plásmido pTM1 que tiene insertado el gen F del VRSH.	Cristina y col., 1990

Tabla 3.1.1. Plásmidos utilizados. Amp^r: gen de resistencia a ampicilina, líder EMC: región no codificante del virus de la encefalomiocarditis, pT7: promotor del fago T7, tT7: terminador de la transcripción del fago T7.

3.1.1.4. Animales

Se emplearon ratones de la cepa BALB/C para obtener los líquidos ascíticos y conejos New Zealand para obtener los sueros policlonales.

3.1.1.5. Anticuerpos

➤ Los **anticuerpos monoclonales (AcMs)** dirigidos frente a la proteína F del VRSH que se han utilizado en este trabajo se obtuvieron en nuestro laboratorio (García-Barreno y col., 1989; Arbiza y col., 1992; López y col., 1993, 1998; Martínez y col., 1997; Wu y col., 2007). Los AcMs 2F, 47F, 56F, 90F, 96F, 99F, 101F y 102F se purificaron a partir del líquido ascítico obtenido de ratones BALB/c a los cuales se les inyectaron las células de hibridomas productoras de cada AcM.

➤ Los **anticuerpos policlonales** se obtuvieron en el laboratorio a partir de sueros de conejos inmunizados con un virus vaccinia que expresa la proteína F completa del VRSH (VAC/F_C) o una forma soluble de ésta (F_{TM}⁻) (VAC/F_{TM}⁻).

3.1.1.6. Péptidos

Los péptidos F157-191 y F160-207 mimetizan secuencias de la región heptádica A (RHA) de la proteína F de la cepa Long del VRSH, mientras que los péptidos F478-512, F478-516 y F488-522 corresponden a aminoácidos de la región heptádica B (RHB). La secuencia de los mismos se muestra en la Tabla 3.1.2.

Todos los péptidos fueron suministrados por el servicio de proteómica del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III a excepción de los péptidos F160-207 y F478-516 que fueron suministrados por el laboratorio del Dr. David Andreu (Universidad Pompeu Fabra, Barcelona).

PÉPTIDO	SECUENCIA
F157-191	VLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSK
F160-207	LEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPV
F478-512	YDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEL
F478-516	YDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNV
F488-522	FDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKST

Tabla 3.1.2. Secuencia de aminoácidos de los péptidos empleados en este trabajo. Los números de los péptidos indican la posición de sus aminoácidos N- y C-terminales en la estructura primaria de la proteína F del VRSH.

3.1.1.7. Antivirales

Los compuestos con acción antiviral empleados fueron cedidos por Arrow Therapeutics, Reino Unido. En la Figura 3.1.3 se indica la estructura química de los mismos.

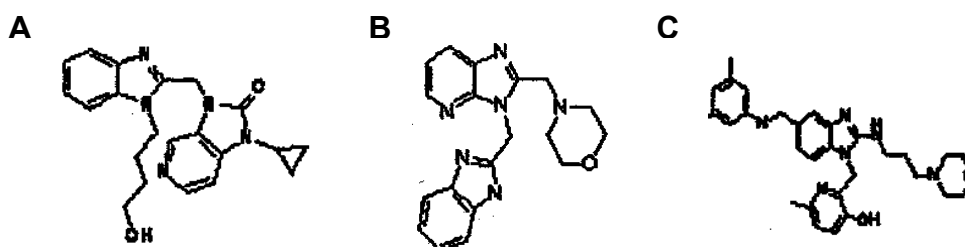


Figura 3.1.3. Compuestos de bajo peso molecular con acción antiviral. A, BMS-433771 (Bristol-Myers Squibb) (Cianci y col., 2004a); B, A-76967 (Trimeris); C, A-77137 (Janssen/Tibotec)

3.1.2 MEDIOS DE CULTIVO

3.1.2.1. Células eucariotas

➤ **DMEM-10, DMEM-2,5, y DMEM-0:** Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Dulbecco y Freeman, 1959) (Gibco), con 4mM glutamina, 100U/ml penicilina, 0,1mg/ml de estreptomicina y enriquecido con 10%, 2,5% suero de ternera fetal (STF) o sin suero, respectivamente. El DMEM-2,5 inactivado, se preparó con STF al que se le inactivó el complemento durante 30 minutos a 60°C.

➤ **DMEM-agar:** Medio DMEM-2,5 enriquecido con un 1% de aminoácidos no esenciales (Biological Industries) y 0,7% de agar noble (Difco).

➤ **RPMI-15:** Medio RPMI 1640 con 4mM Glutamina, 100U/ml penicilina, 0,1mg/ml de estreptomicina y 25mM HEPES (4-(2- hidroxietil)-piperazina-1-etano-ácido sulfónico), enriquecido con 15% STF.

➤ **Optimem:** suministrado por Gibco

➤ **Tripsina-Verseno:** 0,05% tripsina, 0,02% EDTA en PBS.

3.1.2.2. Bacterias

➤ **LB:** 1% bacto-triptona, 1% NaCl y 0,5% extracto de levadura (Bio 101 Systems).

3.1.3. REACTIVOS

➤ Compuestos orgánicos (formaldehído, metanol, etanol, urea, etc.), inorgánicos, detergentes (tritón X-100, deoxicolato sódico y octilglucósido), ácidos, bases, suero de cerdo (SC), seroalbúmina bovina fracción V (SAB) y glicerol fueron suministrados por VWR.

➤ Dimetilsulfóxido (DMSO), biotina, pristano (2-6-10-14 tetrametil-pentadecano), O-fenilendiamina (OPD), 3-amino-9-etil-carbazol (AEC), ditiotreitól (DTT), timerosal, HT (hipoxantina y timidina), antibiótico G418 y Iodoacetoamida se compraron a Sigma.

➤ La papaína y el kit de transfección EugeneHD se compraron a Roche.

- La proteína A-Sepharosa CL-4B y la CNBr-Sepharosa 4B fue suministrada por GE-Healthcare.
- Para la concentración de anticuerpos se utilizó Vivaspin 100 y 10 de Sartorius (Vivascience, Hannover, Alemania).
- Las inmunoglobulinas (Igs) conjugadas con peroxidasa o biotina contra Igs de conejo o de ratón, así como la streptavidina-peroxidasa fueron suministradas por GE-Healthcare, las Igs conjugadas con fluoresceína por Sigma, y la streptavidina-ficoeritrina por Southern Biotechnology.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. MANEJO DE ANIMALES

➤ Para la obtención de líquido ascítico se inyectaron 0,5 ml de Pristano (2-6-10-14 tetrametil-pentadecano) intraperitonealmente (i.p) a ratones BALB/C de 8 meses de edad y 10-15 días después se inyectaron i.p. 5×10^6 células de hibridoma en 0,2 ml de PBS. Cuando se observó crecimiento tumoral se procedió al drenaje y recolección de líquido ascítico que se clarificó por centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos y se repartió en alícuotas que se conservaron a -20°C .

➤ Para la obtención de los sueros policlonales, conejos New Zealand se inocularon con 1×10^7 ufp/conejo de los virus vaccinia recombinantes VAC/F_C o VAC/F_{TM}- purificados por colchón de sacarosa (ver más adelante, 3.2.2.4), por vía intramuscular (i.m) en la pata. La inmunización se repitió a los 20 días. Los conejos se sangraron a partir de 3 semanas después de la última inmunización y los sueros obtenidos se analizaron en ELISA.

3.2.2. MANIPULACIÓN DE CÉLULAS Y VIRUS

3.2.2.1. Cultivo de células eucariotas

Células **HEp-2** y **CV-1** se crecieron en placas Petri con DMEM-10 y las **BSR T7/5** con DMEM-10 sin antibiótico realizando pases alternativos en presencia de antibiótico G418. Se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO_2 y 98% de

humedad. Las monocapas celulares se subcultivaron desprendiéndolas con tripsina-verseno. Para su almacenamiento, las células se resuspendieron en STF con un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) y se congelaron en nitrógeno líquido (Jakoby y Pastan, 1979).

Los **hibridomas** se crecieron en medio RPMI enriquecido con 15% STF y HT.

3.2.2.2. Cultivo de bacterias

Bacterias portadoras de los plásmidos que se utilizaron como vectores se crecieron en medio LB líquido con antibiótico. El DNA se purificó empleando el kit WizardPlusSV Miniprep (Promega).

3.2.2.3. Virus Respiratorio Sincitial humano (VRSH)

A) Crecimiento

Monocapas de células HEp-2 subconfluentes se infectaron con el virus en el menor volumen posible de DMEM-2,5. Al cabo de 1 hora de adsorción a 37°C se añadió medio DMEM-2,5 fresco. Pasadas 48 horas post-infección, cuando el efecto citopático era extensivo, se rasparon las células y se recogieron junto con el sobrenadante. La suspensión de células se almacenó en nitrógeno líquido para su uso posterior.

B) Titulación por tinción inmunohistoquímica

Células HEp-2 creciendo en placas de 96 pocillos (5×10^4 células por pocillo) se infectaron con 50 μ l de diluciones seriadas del stock de virus (previamente centrifugado 30 segundos a 13.000rpm) en medio DMEM-2,5. El virus se dejó adsorber durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se añadieron 150 μ l de DMEM-2,5 y los cultivos se incubaron durante 24-30 horas a 37°C. A continuación, se retiró el sobrenadante, los pocillos se lavaron con PBS frío y las células se fijaron durante 20 minutos a 4°C con 150 μ l de 2% de H₂O₂ en metanol. Seguidamente, se retiró la mezcla de fijación, e inmediatamente después y sin dejarse secar, los

pocillos se lavaron con 150 μ l de PBS-1% SAB y se saturaron con la misma solución durante 30 minutos a temperatura ambiente.

La detección de células infectadas se llevó a cabo mediante la incubación de la monocapa durante 1 hora a temperatura ambiente con una mezcla de AcMs dirigidos contra las glicoproteínas F y G del VRSH (2F, 47F, 56F, 021/1G y 021/21G), y posterior incubación durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo anti-Ig de ratón marcado con peroxidasa diluido en PBS-1% SAB. Entre cada incubación se realizaron dos lavados con PBS-1% SAB. Los complejos inmunes se revelaron con AEC (3-amino-9 etil-carbazol) a 3,3mg/ml diluido en un tampón 0,1M citrato, 0,2M fosfato pH 5,5 y H₂O₂ al 0,06%. Este sustrato genera un producto insoluble cuando se procesa (Graham y col., 1965) que precipita en la célula infectada y la dota de un color rojizo que permite el conteo al microscopio.

C) Titulación por producción de antígeno viral

Se siguió el mismo protocolo de infección que en el apartado anterior pero en este caso las células se fijaron a las 72 horas post-infección con acetona al 80% en PBS durante 15 minutos a 4°C. Seguidamente se cuantificó la cantidad de antígeno viral presente en los pocillos mediante ELISA tal y como se describe en el apartado 3.2.4.1A

3.2.2.4. Virus Vaccinia

A) Crecimiento

Cultivos confluentes de células CV-1 se infectaron con los virus vaccinia recombinantes a una multiplicidad de infección de 0,1 ufp/célula en DMEM-2,5. Después de 1 hora de adsorción a 37°C se retiró el inóculo, se añadió medio DMEM-2,5 fresco y se dejó progresar la infección durante 24-48 horas. Pasado este tiempo se rasparon las células, se recogieron junto con el sobrenadante y se centrifugaron durante 5 minutos a 1.500 rpm. El sedimento se lavó con PBS estéril, se resuspendió en 1mM Na₂HPO₄, se congeló (-80°C) y descongeló (37°C) 3 veces para romper las células, se sonicó en un baño de ultrasonidos durante 2 minutos y se volvió a centrifugar a 1.500 rpm durante 5 minutos para eliminar restos celulares. Por último, el sobrenadante se guardó a -80°C.

Para purificarlo por colchón de sacarosa, el sobrenadante clarificado se ultracentrifugó a 25.000 rpm durante 1 hora y 15 minutos a 4°C en un rotor SW28 a través de un colchón de sacarosa del 45% en 1mM Na₂HPO₄. El sedimento se resuspendió en 1mM Na₂HPO₄ y se guardó a -80°C.

B) Titulación por plaqueo en agar

Monocapas confluentes de células CV-1, se infectaron con diluciones seriadas de virus vaccinia. Después de 1 hora de adsorción a 37°C en medio DMEM-2,5, se retiró el inóculo, se lavaron las células con DMEM-2,5 y se añadió DMEM-agar. A las 48 horas post-infección, las células se fijaron con formaldehído al 10% en PBS completo durante 30 minutos y, una vez retirado el agar, se tiñeron durante 20 minutos con 0,1% cristal violeta en 20% metanol. A continuación se procedió al conteo de las placas de lisis.

3.2.2.5. Preparación de extractos celulares

Monocapas de células HEp-2 se infectaron con el VRSH o con virus vaccinia recombinantes en DMEM-2,5. Al cabo de 1 hora de adsorción del virus a 37°C, se añadió medio fresco. A las 48 horas cuando el efecto citopático era extensivo, se rasparon y se recogieron por centrifugación a 2.500 rpm. El sedimento se lavó con PBS, se centrifugó de nuevo y se resuspendió en tampón de lisis (10mM Tris-HCl pH 7,5, 140mM NaCl, 5mM EDTA) con 1% Tritón X-100 y 1% deoxicolato sódico, o alternativamente en el mismo tampón con un 1% de octil-glucósido como detergente (500µl tampón de extracción/ 1x10⁷ células). El extracto se sonicó a 4°C durante 1 minuto y el material no solubilizado se eliminó centrifugando a 13.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se guardó a -20°C hasta su uso.

3.2.3. PURIFICACIÓN Y MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

3.2.3.1. Purificación de anticuerpos monoclonales (AcMs) y policlonales

Los AcMs se purificaron a partir de líquido ascítico y los policlonales anti-VAC/F_C y anti-VAC/F_{TM}- a partir de sueros de conejo. El material se diluyó 1:2 en tampón de adsorción (1,5M Glicina, 3M NaCl, pH 8,9) y a continuación, se pasó por

una columna de proteína A-Sepharosa, equilibrada en el mismo tampón. Los AcMs unidos a la columna se eluyeron con 0,1M citrato sódico pH 3. El pH de la fracción eluída se neutralizó con Tris saturado. El proceso de purificación se siguió midiendo la absorbancia a 280 nm (DO_{280nm}). La reactividad de los anticuerpos purificados se analizó en ELISA, empleando como antígeno, un extracto de células HEp-2 infectadas con el VRSH. Como control negativo se utilizó un extracto de células HEp-2 sin infectar (Mock).

3.2.3.2. Obtención y purificación de fragmentos Fab

Los AcMs purificados se digirieron con papaína a una concentración de 0,4 mg/ml en PBS incompleto (sin calcio ni magnesio) en presencia del agente reductor cisteína (concentración final de 4,2mM) y EDTA (concentración final de 0,8mM). La relación en masa AcM:papaína fue de 100:1. Tras una incubación de 4h a 37°C, la reacción se paró con Iodoacetamida (preparada en el acto a 300mM en PBS), a una concentración final de 6mM. La mezcla de reacción se dejó 15 minutos a temperatura ambiente.

Una vez digerido el AcM, se pasó por una columna de afinidad de proteína A-Sepharosa equilibrada y lavada en PBS hasta que la DO_{280nm} del material que salía de la columna era $<0,1$. En las fracciones no retenidas de la columna se obtienen los fragmentos Fab ya que la región Fc de los anticuerpos se une a la proteína A. Seguidamente, se eluyeron los fragmentos Fc y los posibles AcMs no digeridos con tampón citrato 0,1M pH3,0 hasta que la DO_{280nm} del eluído era $<0,02$. Las fracciones correspondientes a la proteína no retenida (Fab) se juntaron y se neutralizó el pH con Tris saturado, concentrándose posteriormente con Vivaspin 10 (10kDa). A continuación, los fragmentos Fab se pasaron por una columna de filtración en gel o exclusión molecular Superdex 200 10/300 GL equilibrada en tampón $NaHPO_4/Na_2HPO_4$ 0,05M, pH 7,0, NaCl 0,15M, para separarlos de anticuerpos intactos o fracciones Fc no retenidos en la columna o de productos de la degradación enzimática.

El proceso de purificación se siguió por DO_{280nm} y por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) en presencia de 5% β -Mercaptoetanol, y tinción con Azul de Coomassie. La reactividad de las fracciones, obtenidas a lo largo de todo el proceso de purificación, se analizó mediante ELISA empleando como

antígeno extracto de células HEp-2 infectadas con el VRSH. Como control negativo se utilizó un extracto de células HEp-2 sin infectar (Mock).

3.2.3.3. Preparación de columnas de inmunoafinidad

Las columnas de afinidad se prepararon con el AcM 2F, dirigido contra la proteína F del VRSH (García-Barreno y col., 1989), o con la proteína F_{TM}- purificada (Calder y col., 2000). El anticuerpo o proteína F purificada se acoplaron a una matriz de CNBr-Sepharosa 4B (GE-Healthcare) utilizando una relación 1:100 (masa anticuerpo o proteína F : masa Sepharosa), según el protocolo recomendado por el proveedor. Para ello, la resina se hidrató con HCl 1mM, se lavó con 1mM HCl y H₂O y se equilibró en tampón de acoplamiento (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3). El AcM 2F o la proteína F_{TM}- dializados frente al mismo tampón de acoplamiento, se mezclaron con la resina y las mezclas respectivas se incubaron toda la noche a 4°C con agitación suave. Seguidamente, se bloquearon los grupos activos de las resinas que no habían reaccionado con 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 8,0 durante 3 horas a temperatura ambiente. Por último, las resinas se lavaron tres veces de forma alternativa con 0,1 M acetato de sodio, 0,5 M NaCl, pH 4,0 y con 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 8,0. Las resinas con el anticuerpo o con la proteína se guardaron a 4°C en 0,01% timerosal en PBS.

3.2.3.4. Purificación de la proteína F_{TM}- del VRSH

Células HEp-2 se infectaron en DMEM-0 con un virus vaccinia en cuyo genoma estaba clonado el gen que codifica para la proteína F_{TM}- (VAC/F_{TM}-). La infección se dejó progresar durante 48-72 horas hasta observar un efecto citopático total. La ausencia de la región transmembranal en esta proteína hace que se secrete al medio extracelular; de manera que se recogió el sobrenadante de los cultivos y se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 minutos en un rotor JA-14 a 4°C para eliminar los restos celulares.

El sobrenadante de la centrifugación se precipitó con (NH₄)₂SO₄ al 65% de saturación a 4°C. La proteína precipitada se centrifugó a 13.000 rpm durante 45 minutos, en un rotor JA-14, a 4°C. El precipitado se resuspendió en PBS en 1:50 del volumen inicial y se dializó frente a PBS a 4°C. Seguidamente, el material dializado

se añadió a una resina de Sepharosa-2F (preparada como se ha descrito en el apartado anterior) y se incubó durante toda la noche a 4°C con agitación suave. Posteriormente se empaquetó la resina en una columna y, una vez recogido el material no unido a la resina, ésta se lavó con PBS hasta que el eluido tenía una $DO_{280nm} \leq 0,1$. La proteína F_{TM}- retenida en la columna se eluyó con tampón 0,1M Glicina-HCl pH 2,5 y se neutralizó con Tris saturado.

3.2.3.5. Purificación de anticuerpos que reconocen a la proteína F_{TM}-

Anticuerpos anti-F_C o anti-F_{TM}- purificados a partir de sueros de conejos (ver apartado 3.2.1), se añadieron a una resina de Sepharosa-F_{TM}-, preparada como se indicó en el apartado 3.2.3.3. Seguidamente, la resina se incubó durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, la resina se puso en una columna y tras recogerse el material no retenido (NR), la columna se lavó con PBS hasta que el eluido tenía una $DO_{280nm} \leq 0,1$. La proteína retenida en la columna se eluyó con tampón 0,1M Glicina-HCl pH 2,5 y se neutralizó el pH con Tris saturado.

3.2.3.6. Depleción de anticuerpos anti-Vaccinia (anti-VAC) o anti-VacciniaF (anti-VAC/F)

Células HEp-2 se infectaron con los recombinantes VAC/P o VAC/F_C a una moi de 0,6 ufp/célula. Las células se despegaron de las placas de cultivo a las 24 horas post-infección con PBS-EDTA 10mM, se lavaron y se resuspendieron con 5% suero de cerdo (SC) diluido en PBS y se incubaron con anticuerpos policlonales purificados (apartado 3.2.3.1) durante 30 minutos a temperatura ambiente (10^6 células/ μ g anticuerpo). Posteriormente, la mezcla se centrifugó durante 2 minutos a 2.500 rpm. La ausencia en el sobrenadante de los anticuerpos adsorbidos a las células se comprobó mediante ELISA y/o citometría de flujo.

3.2.3.7. Marcaje de anticuerpos con biotina

Preparaciones de anticuerpos a 1mg/ml se dializaron exhaustivamente frente a Na₂CO₃ 0,1M, NaCl 0,15M pH9,0, a 4°C. A continuación, se añadió un 10% (v:v) de biotina 1mg/ml (biotina succinimido ester, BMSE) y la mezcla se dejó 2 horas rotando a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se dializó frente a PBS a

4°C durante la noche. Los anticuerpos biotinilados se conservaron en timerosal al 0,01% en PBS a 4°C.

3.2.4. TÉCNICAS INMUNOQUÍMICAS

3.2.4.1. ELISA

A) Directo

Placas de cloruro de polivinilo de 96 pocillos (Cultek) se cubrieron con 50µl de antígeno diluido en PBS y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Los pocillos se saturaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con 150µl de seroalbúmina (SAB) al 1% en PBS para los anticuerpos monoclonales (AcMs) y fragmentos Fab o con 5% suero de cerdo (SC) diluido en 0,05% Tween20 en PBS para los sueros y anticuerpos policlonales. A continuación, se retiró el líquido de los pocillos y éstos se incubaron 1 hora a 37°C con 50µl de los AcMs, fragmentos Fab o anticuerpos policlonales diluidos en el tampón respectivo. Tras descartar los anticuerpos no unidos a los pocillos y lavar éstos exhaustivamente con H₂O, los complejos inmunes se detectaron mediante incubación, durante 1 hora a temperatura ambiente, con 50µl de un anticuerpo secundario anti-Ig específico de especie conjugado con peroxidasa, seguido de 50µl del sustrato comercial OPD (Sigma) diluido en un tampón 0,1M citrato, 0,2M fosfato pH5,5 y H₂O₂ al 0,06%. La reacción colorimétrica se paró añadiendo H₂SO₄ 3N y la absorbancia en cada pocillo se midió a 490nm.

Cuando se utilizaron fragmentos Fab, los complejos inmunes se detectaron mediante incubación, durante 1 hora a 37°C, con 50µl de un anticuerpo secundario anti-kappa de ratón biotinilado, seguido de una incubación con streptavidina-peroxidasa durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron con H₂O exhaustivamente entre cada una de esas incubaciones y posteriormente se añadieron 50µl de OPD como se indicó anteriormente.

B) Indirecto

Placas de cloruro de polivinilo (Cultek) se recubrieron con 100µl por pocillo de anticuerpo de captura (400 ng total) dirigido contra la proteína F del VRSH y diluido

en PBS, y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Los pocillos se saturaron durante 30 minutos con 150µl de SC al 5% en 0,05% de Tween-20 en PBS. A continuación, los pocillos se incubaron durante 2 horas a 37°C con 100µl de extractos celulares (ver apartado 3.2.2.5), diluídos en el tampón anterior y se lavaron con agua. Posteriormente, los pocillos se incubaron durante 1 hora a 37°C con los anticuerpos marcados con biotina (apartado 3.2.3.7) diluídos en el tampón anterior y se lavaron con agua. Los complejos inmunes se detectaron con streptavidina-peroxidasa, diluída en 5% de SC en PBS, durante 30 minutos a temperatura ambiente y se revelaron con sustrato OPD. La reacción colorimétrica se paró añadiendo 3N H₂SO₄, y la densidad óptica se midió a 490 nm.

3.2.4.2. Citometría de flujo

Células HEp-2 se infectaron con el VRSH o con VAC/F_C o VAC/P en DMEM-2,5. A las 24 horas, las células se lavaron con PBS y se despegaron con PBS-EDTA 10mM. A continuación, las células se lavaron dos veces con 1ml de 5% de SC en PBS, se resuspendieron en el mismo tampón y 5 x 10⁵ células se incubaron durante 30 minutos en hielo con las preparaciones de anticuerpos. Pasado este tiempo, se lavaron de nuevo las células 2 veces con 1 ml de 5% SC en PBS, y se incubaron con un anticuerpo secundario marcado con biotina (GE-Healthcare) a una dilución 1:1000 en 5% de SC en PBS, durante 30 minutos a 4°C. Seguidamente, las células se lavaron como en el paso anterior y por último se incubaron durante 30 minutos a 4°C con streptavidina-ficoeritrina (Southern Biotechnology) a una dilución 1:300 en 5% de SC en PBS. Después de tres lavados realizados de la misma forma que anteriormente, las células se fijaron con 1,4%-paraformaldehído en PBS y se analizaron en un citómetro de flujo FACSCanto (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Los datos se analizaron con el software FlowJo (Tree Star).

3.2.4.3. Ensayo de neutralización

Se llevó a cabo de dos maneras distintas:

A) Para ensayar la neutralización **durante la infección**, células HEp-2 creciendo en pocillos de una placa de 96 pocillos se infectaron con 50µl de la cepa Long del VRSH (previamente centrifugado 30 segundos a 13.000rpm), incubado

durante 30 minutos a 37°C en presencia o ausencia de distintas cantidades de anticuerpos, péptidos o antivirales diluidos en DMEM con STF al 2,5% inactivado. Tras dejar un periodo de 1 hora de adsorción del virus, se añadió más DMEM con 2,5% de STF inactivado.

A las 72 horas post-infección, las células se fijaron durante 15 minutos a 4°C, añadiendo 100µl de acetona al 80% en PBS a cada pocillo. Tras retirar el sobrenadante, los pocillos se saturaron con 150µl de SC al 5% en 0,05% de Tween-20 en PBS. La cantidad de antígeno viral producido en la monocapa de células infectadas se detectó mediante ELISA directo, con una mezcla de anticuerpos monoclonales dirigidos contra las proteínas F y G del VRSH (2F, 47F, 56F, 021/1G, 021/21G) como se describió en el apartado 3.2.4.1A.

B) Para ensayar la neutralización **antes de la infección**, el virus se incubó con los anticuerpos, antivirales o péptidos durante 30 minutos a 37°C. Seguidamente, el virus se sedimentó mediante centrifugación a 35.000rpm durante 2 horas a 4°C en un rotor SW60 a través de un colchón de glicerol del 25% en PBS. El sedimento se resuspendió en medio DMEM con 2,5% de STF inactivado y se hicieron diluciones seriadas con las que se infectaron células HEp-2. El resto del proceso se llevó a cabo como se indicó en la parte A de este apartado.

3.2.4.4. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Monocapas de células HEp-2, crecidas con DMEM-10 en pocillos de cámaras de cultivo (Nunc) se infectaron con la cepa Long del VRSH a una *moi* de 1 ufp/célula, como se indicó en el apartado 3.2.2.3. A los tiempos indicados para cada experimento, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron con PBS precalentado a 37°C. Seguidamente las células se fijaron con metanol durante 5 minutos y con acetona durante 30 segundos, ambos pre-enfriados a -20°C, dejándose posteriormente secar a temperatura ambiente. Después de bloquear los sitios de unión inespecífica con 1% SAB-PBS, las células se incubaron con una mezcla de AcMs dirigidos contra las proteínas F y G del VRSH (2F, 47F, 56F, 021/1G, 021/21G) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron con PBS e incubaron con un anticuerpo secundario anti-Ig de

ratón conjugado con fluoresceína (Sigma) diluido en 1%-SAB-PBS. Por último, las células se lavaron con PBS y H₂O y se observaron en un microscopio Zeiss equipado con un sistema de epifluorescencia.

3.2.4.5. Ensayo de inhibición de formación de sincitios por anticuerpos

Este ensayo se realizó tanto en células **infectadas (A)** como en células **transfectadas (B)**:

A) Células HEp-2 se infectaron con la cepa Long del VRSH como se indicó en el apartado 3.2.2.3. Tras 90 minutos de adsorción del virus a 37°C, se quitó el inóculo, se añadió medio y después de 5 horas a 37°C, se añadieron los anticuerpos y los cultivos se mantuvieron a 37°C en DMEM-2,5 hasta las 48 horas, en que las células se procesaron para IFI como se describió en el apartado anterior. El efecto de los anticuerpos sobre la formación de sincitios se evaluó tras examinarse los cultivos en un microscopio Zeiss equipado con un sistema de epifluorescencia.

B) Monocapas confluentes de células BSR T7/5 se crecieron en microcámaras con DMEM-10 sin antibiótico y se transfectaron con 500ng de DNA del plásmido pTM1-F que lleva clonado el gen que codifica para la proteína F del VRSH. Se utilizó FugeneHD (Roche) en proporción 2:1 (μ l Fugene/ μ g DNA). Para ello, el DNA se llevó hasta 20 μ l con medio Optimem (Gifco) y se incubó con 1 μ l de Fugene durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de transfección se añadió a las células en medio DMEM-0. Tras un periodo de incubación de 7 horas a 37°C, se retiró la mezcla de transfección, se lavó 2 veces con DMEM-2,5 y se añadieron los anticuerpos. Los cultivos se mantuvieron a 37°C hasta 48 horas después de la transfección, en que se procesaron por inmunofluorescencia indirecta (IFI) como se describió en el apartado 3.2.4.4.

3.2.4.6. Resonancia de plasmón de superficie (*Biacore*)

Las constantes de afinidad (K_D) de los AcMs o del fragmento Fab con la proteína F del virus se determinaron por resonancia de plasmón de superficie usando el Biacore 3000 (Biacore, Uppsala, Suecia).

La proteína $F_{TM^-/NN}$ (mutante que evita la agregación de la proteína) a $0,5 \mu M$ en tampón acetato pH 5, se acopló covalentemente al chip CM4 activado con $0,05 M$ NHS/ $0,2 M$ EDC (N-hidroxisuccimida/ N-etil-N'-(dimetilaminopropil)-carbodiimido). Los grupos éster no activados se bloquearon con etanolamina-HCl $1 M$ pH 8,5 al igual que la celda de referencia. Diluciones seriadas de los AcMs purificados o fragmento Fab en tampón HBS-EP ($10 mM$ HEPES pH 7,4, $150 mM$ NaCl, $3 mM$ EDTA, $0,005\%$ surfactante P20) se inyectaron sobre la proteína $F_{TM^-/NN}$ y sobre la celda de referencia, a un flujo de $10 \mu l/min$, el tiempo necesario hasta alcanzar las unidades arbitrarias de resonancia (RU) deseadas. Tras este tiempo, se pasó el tampón HBS-EP para la disociación del anticuerpo. Después de cada medida, el AcM o fragmento Fab residual se eliminó del chip por la inyección de $0,1 M$ Glicina - HCl pH 2,0.

Una vez obtenidos los sensogramas, las constantes de afinidad (K_D) se calcularon utilizando el programa BIAevaluation siguiendo el modelo de Langmuir 1:1. Este programa calcula la constante de afinidad (K_D) dividiendo las pendientes de las curvas de disociación (K_d) y asociación (K_a) en un rango de concentraciones.

4. RESULTADOS

4.1. NEUTRALIZACIÓN DEL VRSH POR ANTICUERPOS MONOCLONALES Y FRAGMENTOS Fab DIRIGIDOS CONTRA LA PROTEÍNA F

4.1.1. Purificación y capacidad neutralizante de anticuerpos monoclonales (AcMs) que reconocen a la proteína F del VRSH

En la proteína F se han identificado cinco sitios antigénicos que contienen epítomos reconocidos por distintos anticuerpos monoclonales (AcMs) (Beeler y Van Wyke Coelingh, 1989; García-Barreno y col., 1989; Bourgeois y col., 1991; Arbiza y col., 1992; López y col., 1998; Wu y col., 2007). Con el fin de comparar las propiedades de anticuerpos que reconocen epítomos de los distintos sitios antigénicos, se seleccionaron para este estudio los AcMs de la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Anticuerpos monoclonales que reconocen epítomos de distintos sitios antigénicos en la proteína F

Sitio antigénico ^a	AcM	Cambios de aminoácido que producen pérdida de reactividad con los AcMs
I	2F	P389S/L/H
	90F	P389S/L/H
	96F	P389S/L/H
	99F	ND
II	47F	N262Y, N268I, K272E, S275F
IV	56F	R429S, K433T
	101F	R429S, K433T
	102F	R429S, K433T

^a Los anticuerpos monoclonales se clasificaron en los sitios antigénicos I, II y IV, basándose en la competición para su unión simultánea al antígeno y en la reactividad con mutantes de escape que tienen los cambios de aminoácidos indicados en la columna de la derecha (García-Barreno y col., 1989; López y col., 1998; Arbiza y col., 1992; Wu y col., 2007). ND: no detectado

Los anticuerpos monoclonales 2F, 90F, 96F y 99F reconocen epítomos del sitio antigénico I definido por la competición entre anticuerpos para unirse simultáneamente al antígeno. Mutantes de escape a la neutralización con el cambio

P389L o P389H, y la cepa del grupo antigénico B (CH18537) del VRSH que tiene el cambio P389S, no reaccionan con los AcMs del sitio antigénico I (excepto el AcM 99F) (López y col., 1998). El único AcM disponible en el laboratorio que reconoce un epítipo del sitio antigénico II es el 47F. Este AcM no reconoce mutantes de escape que tienen alguno de los cambios N262Y, N268I, K272E y S275F (García-Barreno y col., 1989). Por último, los AcMs 56F, 101F y 102F reconocen epítopos del sitio antigénico IV y no reconocen mutantes de escape con los cambios R429S o K433T (Arbiza y col., 1992; López y col., 1998; Wu y col., 2007).

Células de hibridoma productoras de cada uno de los anticuerpos se crecieron como tumor ascítico en ratones BALB/c. A partir del líquido ascítico, se purificaron los AcMs por una columna de proteína A-Sepharosa como se indica en Métodos (apartado 3.2.3.1).

La unión de los AcMs a un extracto de células HEp-2 infectadas con la cepa Long del VRSH se analizó por ELISA. Como se muestra en la Figura 4.1A, todos los AcMs reconocieron a la proteína F de los extractos. A pesar de no detectarse diferencias significativas en el título de los AcMs por ELISA, se observaron diferencias en su capacidad neutralizante. Ésta, se analizó midiendo la reducción de antígeno viral producido cuando la infección se llevó a cabo en presencia de cantidades crecientes de cada uno de los anticuerpos. Como se observa en la Figura 4.1B los AcMs 47F (sitio antigénico II) y 101F (sitio antigénico IV) fueron los únicos capaces de neutralizar totalmente la infectividad viral ya que para una cierta cantidad de anticuerpo se eliminó por completo la producción de antígeno viral. Por el contrario, los AcMs 2F, 90F, 96F y 99F correspondientes al sitio antigénico I y los AcMs 56F y 102F del sitio antigénico IV redujeron al 40-60% el antígeno viral producido, en presencia de cantidades bajas de anticuerpo. Sin embargo, esta reducción no fue más allá al aumentar la cantidad de anticuerpo. Con estos resultados, se puede establecer una clasificación de los AcMs analizados en: i) altamente neutralizantes (47F y 101F) y ii) parcialmente neutralizantes (el resto).

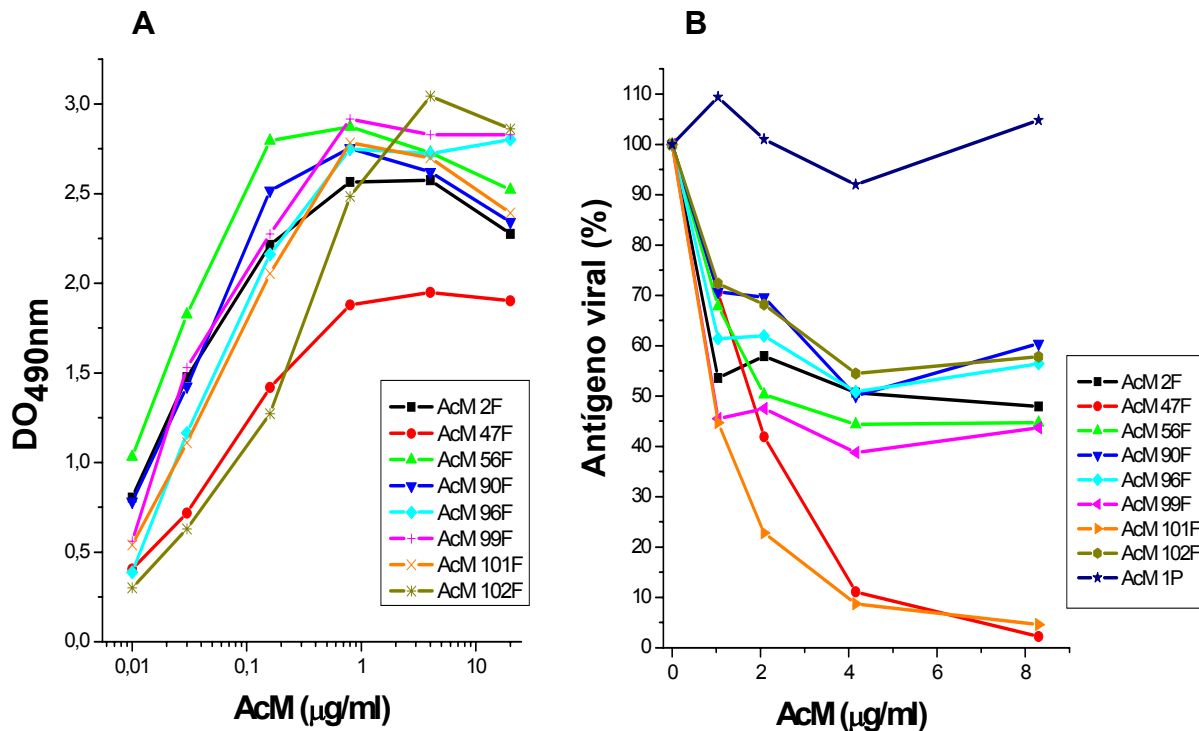


Figura 4.1. Titulación por ELISA (A) y capacidad neutralizante (B) de los AcMs anti-F con la cepa Long de VRSH. A: Diluciones seriadas de los AcMs se ensayaron en un ELISA directo frente a extractos de células infectadas con el VRSH (cepa Long). B: Células HEp-2 se infectaron con $6,5 \times 10^3$ ufp de la cepa Long del VRSH. El virus se preincubó durante 30 minutos a 37°C con distintas cantidades de cada anticuerpo y la mezcla virus/anticuerpo se utilizó para infectar los cultivos. Como control negativo se utilizó el AcM 1P dirigido contra la fosfoproteína del virus. La infectividad viral a las 72 horas se cuantificó midiendo la cantidad de antígeno viral producido y se representa como el porcentaje del valor obtenido en ausencia de anticuerpo (apartado 3.2.4.3A de Métodos).

Como se ha mencionado en la Introducción, durante el proceso de fusión de membranas, la proteína F experimenta una serie de cambios conformacionales, pasando de una conformación metaestable pre-fusión a una conformación final post-fusión, altamente estable (Russell y col., 2006). El bloqueo de alguno de dichos cambios conformacionales conduce a la neutralización viral. Puesto que los ensayos de neutralización de la Figura 4.1B se habían realizado incubando el virus con los anticuerpos y manteniendo éstos en el cultivo durante toda la infección, nos propusimos evaluar si los anticuerpos eran capaces de neutralizar al virus antes del contacto virus-célula; es decir, antes de la activación de la proteína F. Para estos experimentos, se seleccionaron el AcM 2F (sitio antigénico I) que ejerce una inhibición parcial de la infectividad viral y los AcMs altamente neutralizantes 47F (sitio antigénico II) y 101F (sitio antigénico IV).

Como se esquematiza en la Figura 4.2, el virus se incubó en presencia (Figura 4.2a) o ausencia (Figura 4.2b) de los anticuerpos. Tras la incubación, el virus se sedimentó por ultracentrifugación, como se indicó en Métodos (apartado 3.2.4.3B), para separarlo de los anticuerpos no unidos a las partículas virales. Seguidamente, se evaluó la infectividad presente en los sedimentos en un ensayo donde se añadieron éstos a células y se estimó la cantidad de antígeno viral producido a las 72 horas post-infección. Una parte del virus preincubado sin anticuerpo y ultracentrifugado, se añadió a las células en presencia de los distintos anticuerpos (Figura 4.2b2) para comprobar si todavía era sensible a la neutralización.

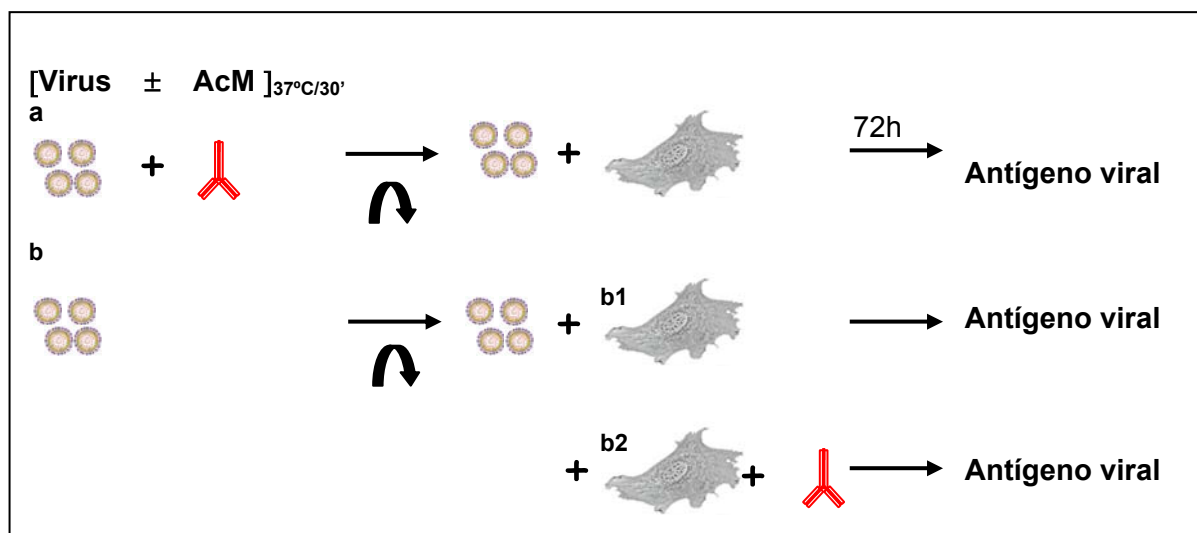


Figura 4.2. Esquema de ensayo de neutralización con virus ultracentrifugado. Una cantidad de virus Long se incubó durante 30 minutos a 37°C en presencia (a) o en ausencia (b) de anticuerpo. Posteriormente, se sometió a ultracentrifugación (↻) y tras ésta, se ensayó la infectividad presente en el sedimento. Una parte de virus incubado sin anticuerpo (b) y ultracentrifugado se añadió a las células en presencia de anticuerpo (b2). Se cuantificó la cantidad de antígeno viral a las 72 horas post-infección.

El resultado de este experimento se muestra en la Figura 4.3. Cuando el virus se incubó con los AcMs 47F y 101F antes de la ultracentrifugación, la infectividad presente en el sedimento se redujo a valores prácticamente negativos (Figura 4.3A). Por el contrario, la incubación del virus con el AcM 2F antes de la ultracentrifugación no afectó de manera significativa la infectividad viral presente en el sedimento, de manera análoga a como lo hizo una preparación de inmunoglobulinas de ratón, utilizada como control negativo. Para comprobar que el virus sedimentado era todavía susceptible a la neutralización por anticuerpos, distintas alícuotas de virus

centrifugado en ausencia de anticuerpo se preincubaron con los distintos anticuerpos y las mezclas respectivas se utilizaron para infectar células HEp-2 (Figura 4.2B). De nuevo, la cantidad de antígeno viral producido a las 72 horas se redujo a valores insignificantes cuando el virus se incubó con los anticuerpos 47F o 101F. Sin embargo, en estas condiciones, el AcM 2F redujo la producción de antígeno viral a un 40% del producido cuando el virus se incubó en ausencia de anticuerpo. De nuevo, el control de inmunoglobulinas de ratón no tuvo un efecto significativo sobre la infectividad del virus en estas condiciones. Por tanto, los anticuerpos altamente neutralizantes, como el 47F y el 101F (Figura 4.1), son capaces de inhibir la infectividad del VRSH incluso antes de que el virus entre en contacto con las células; es decir, deben de unirse a la forma pre-activa de la proteína F e inhibir su posterior activación cuando el virus se une a la célula. Por el contrario, los anticuerpos parcialmente neutralizantes, como el 2F (Figura 4.1), sólo inhiben la infectividad de forma parcial si están presentes durante el momento de la infección; por tanto, deben actuar sobre la proteína F en alguna etapa posterior a la unión del virus a la célula.

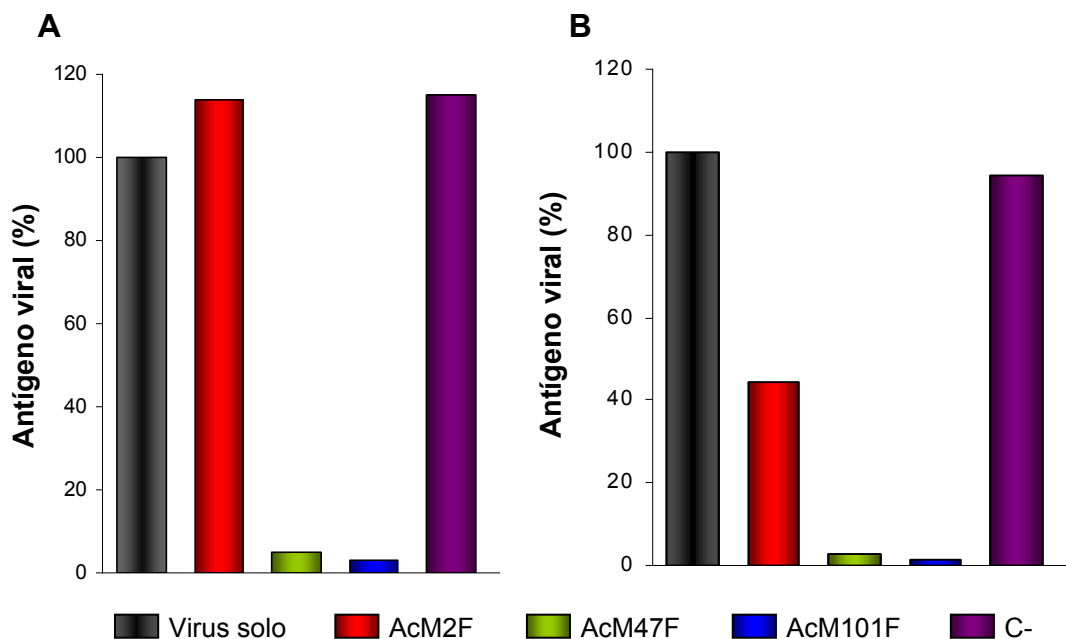


Figura 4.3. Capacidad neutralizante de AcMs anti-F incubados antes (A) o durante (B) la infección con la cepa Long del VRSH. A: $8,2 \times 10^5$ ufp de virus se preincubaron en ausencia o en presencia de 800µg/ml de los AcMs anti-F indicados en la Figura. Posteriormente, la mezcla de virus y anticuerpo se sometió a ultracentrifugación (35.000rpm, 2 horas) y tras ésta, el virus presente en el sedimento se añadió a las células como se describe en Métodos (3.2.4.3B). B: 1×10^5 ufp de virus ultracentrifugado se incubó con 20µg/ml de los AcMs anti-F y la mezcla se añadió directamente a las células, como se describe en Métodos (3.2.4.3A). La infectividad viral se cuantificó midiendo la cantidad de antígeno viral producido y se representa como el porcentaje del valor obtenido en ausencia de anticuerpo (barra negra). Como control negativo de la neutralización se utilizó una preparación de inmunoglobulinas de ratón (barra morada).

4.1.2. Inhibición de la formación de sincitios por AcMs anti-F

Como se ha mencionado en la Introducción, la proteína F no sólo promueve la fusión entre la membrana viral y celular (entrada del virus) sino también la fusión de la membrana de la célula infectada con la de las células adyacentes, dando lugar a la formación de células multinucleadas denominadas sincitios. Aunque probablemente los mecanismos que operan en ambos procesos de fusión de membranas sean muy parecidos, puede haber diferencias entre los mismos. Por tanto, era importante comparar la capacidad neutralizante de los AcMs dirigidos contra la proteína F con su capacidad para inhibir la formación de sincitios.

Cultivos de células HEp-2 se infectaron con el VRSH y 90 minutos después, tras la entrada del virus en la célula, se quitó el inóculo, se añadió medio y 5 horas más tarde, se añadieron al medio de cultivo cada uno de los AcMs purificados. La formación o no de sincitios se observó a las 48 horas por inmunofluorescencia con una mezcla de anticuerpos anti-F y anti-G.

Como se observa en la Figura 4.4, los AcMs 47F y 101F, que tienen una alta capacidad neutralizante, inhibieron la formación de sincitios promovida por la proteína F que se expresa en la membrana de las células infectadas. Así, en presencia de estos anticuerpos, se observaron sólo células fluorescentes individuales pero no sincitios. Por el contrario, los AcMs parcialmente neutralizantes 2F, 56F, 90F, 96F, 99F y 102F no fueron capaces de inhibir la formación de sincitios. Por tanto, hubo una estricta correlación entre la capacidad neutralizante de los anticuerpos y la capacidad de los mismos para inhibir la fusión de membranas celulares que conduce a la formación de sincitios.

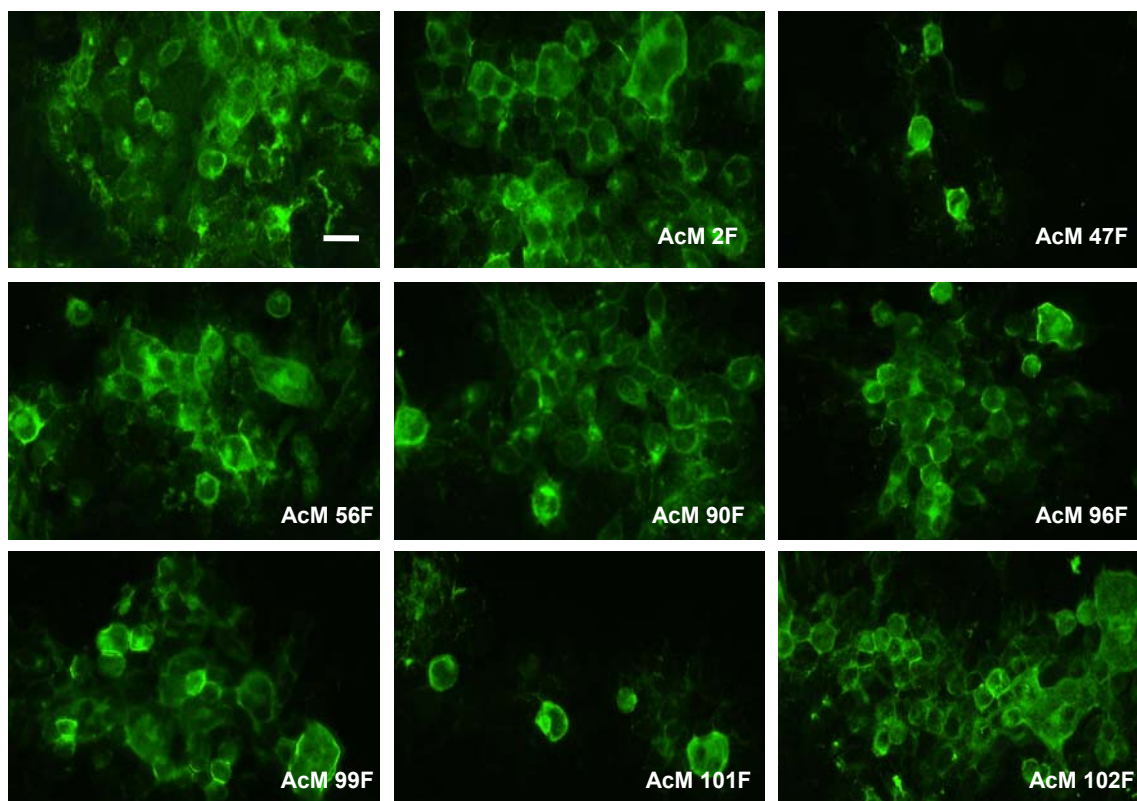


Figura 4.4. Ensayo de inhibición de formación de sincitios mediado por AcMs dirigidos contra la proteína F del VRSH. Células HEP-2 se infectaron con la cepa Long del VRSH. Después de 90 minutos de adsorción del virus a 37°C se quitó el inóculo, se añadió medio y tras 5 horas se añadieron a los distintos cultivos los AcMs (40µg/ml) indicados en cada panel. La formación o no de sincitios se observó a las 48 horas por inmunofluorescencia con una mezcla de anticuerpos anti-F y anti-G como se describe en Métodos (3.2.4.4).

4.1.3. Comparación de la capacidad neutralizante de AcMs anti-F y fragmentos Fab

Para evaluar si la bivalencia de los AcMs es necesaria para neutralizar al virus, se obtuvieron los fragmentos Fab de determinados AcMs para cuantificar su capacidad neutralizante. Para este estudio, se seleccionó el AcM 2F (parcialmente neutralizante) y el 101F (altamente neutralizante). Una vez obtenidos los fragmentos Fab, como se indica en Métodos (3.2.3.2), se comprobó su capacidad de unión a la proteína F. Como se observa en la Figura 4.5A, tanto los AcMs como los fragmentos

Fab reconocieron a la proteína F en ELISA, utilizando como antígeno un extracto de células HEp-2 infectadas con la cepa Long del VRSH. Las diferencias de reactividad que se observan entre los anticuerpos y los fragmentos Fab, podrían deberse a diferencias en la afinidad por la proteína F, o a una inactivación parcial de los fragmentos Fab durante el proceso de obtención y purificación. Seguidamente, se comparó la capacidad neutralizante de cada anticuerpo y su correspondiente fragmento Fab. Como se observa en la Figura 4.5, el AcM 2F (sitio antigénico I) inhibió parcialmente la infectividad viral (~40%) (panel B), tal como se había visto en la Figura 4.1, mientras que su fragmento Fab tuvo un efecto mínimo, no significativo, sobre la misma (panel C). Por el contrario, el AcM 101F (sitio antigénico IV) neutralizó prácticamente toda la infectividad del virus (panel B), reproduciendo los resultados de la Figura 4.1, y su fragmento Fab redujo significativamente la infectividad viral. La falta de neutralización completa del VRSH por el fragmento Fab del anticuerpo 101F se debe probablemente, a que no se llegó a alcanzar una concentración suficiente del mismo en el ensayo.

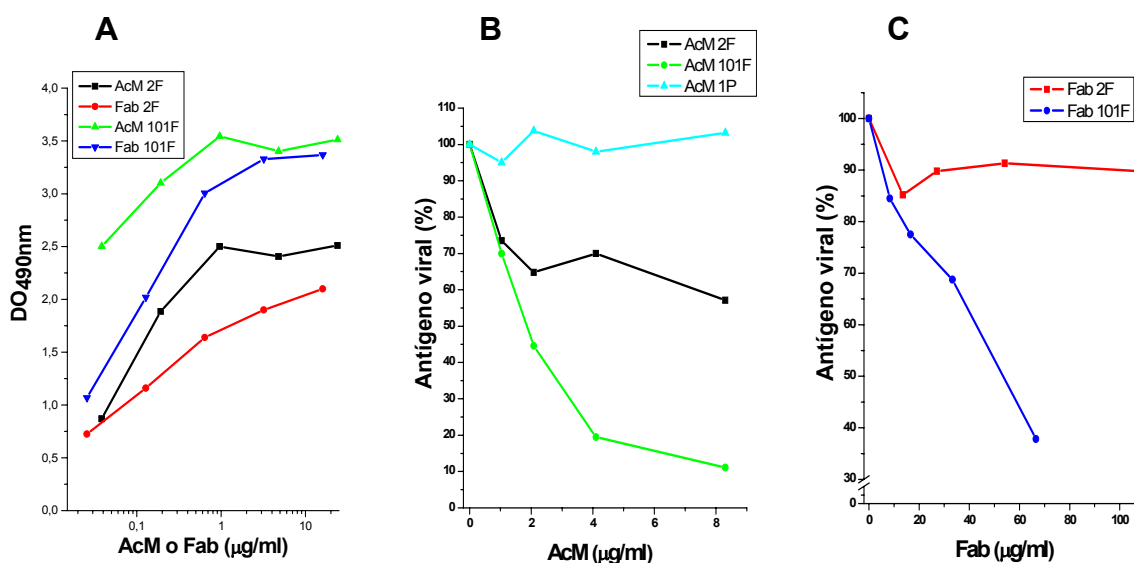


Figura 4.5. Titulación por ELISA (A) y capacidad neutralizante (B,C) de AcMs anti-F y de fragmentos Fab con la cepa Long de VRSH. A: Diluciones seriadas de los AcMs y de los fragmentos Fab indicados en cada panel se ensayaron frente a extractos de células infectadas con el VRSH (cepa Long) en un ELISA directo que se reveló con un anticuerpo secundario anti-kappa (apartado 3.2.4.1A de Métodos). B,C: Células HEp-2 se infectaron con $6,5 \times 10^3$ ufp del VRSH (cepa Long) preincubado con distintas cantidades de cada anticuerpo o fragmento Fab. Como control negativo se utilizó el AcM 1P dirigido contra la fosfoproteína del virus. La infectividad viral se cuantificó midiendo la cantidad de antígeno viral producido a las 72 horas post-infección y se representa como el porcentaje del valor obtenido en ausencia de anticuerpo (apartado 3.2.4.3A).

Estos resultados sugieren que el AcM 101F neutraliza al VRSH por un mecanismo distinto al del AcM 2F. La neutralización parcial por el AcM 2F podría ser el resultado del entrecruzamiento de moléculas de proteína F en la partícula viral o agregación de partículas virales, para lo que se requeriría la bivalencia del anticuerpo y por ello, el fragmento Fab no es capaz de neutralizar al virus. Por el contrario, la bivalencia no es imprescindible para la neutralización por el AcM 101F, por lo que la inhibición de la infectividad en este caso debe ser un efecto directo de la unión del anticuerpo sobre la molécula de proteína F.

4.1.4. Comparación de las constantes de afinidad de los AcMs 2F y 101F y del fragmento Fab del AcM 101F

Para analizar si las diferencias observadas entre AcMs y fragmentos Fab en su capacidad de unión a la proteína F y en su capacidad neutralizante eran debidas a diferencias en la afinidad por la proteína F, se determinaron las constantes de afinidad (K_D) de los AcMs 2F y 101F y del fragmento Fab del AcM 101F, mediante resonancia de plasmón de superficie en un Biacore, como se describió en Métodos (apartado 3.2.4.6).

Para ello, se utilizó como antígeno una proteína $F_{TM^+/NN}$ purificada (forma soluble de la proteína F en la que se han cambiado los aminoácidos de los sitios de corte I y II para evitar su corte y agregación). Dicha proteína, se unió covalentemente a un chip y se pasaron diluciones seriadas de los AcMs y Fab en un rango de concentración de 0,5nM a 75nM. Los resultados se muestran en la Figura 4.6; cada curva representa la asociación y la disociación del anticuerpo a la proteína, medida como cambios en el índice de refracción en la superficie del chip. El valor de la constante de afinidad (K_D) de cada anticuerpo o fragmento Fab se determinó como la media de las K_D obtenidas para las distintas concentraciones de los mismos.

Las constantes de afinidad del AcM 2F (parcialmente neutralizante) y del AcM 101F (altamente neutralizante) resultaron ser muy similares indicando que las diferencias en la capacidad neutralizante de estos dos anticuerpos no se deben, aparentemente, a diferencias en sus constantes de afinidad. Además, la constante de afinidad del AcM 101F resultó ser cinco veces mayor que la de su fragmento Fab.

Esta diferencia es significativamente menor que la que se observó en el ensayo de neutralización, donde la capacidad neutralizante del anticuerpo, medida como la cantidad de anticuerpo necesaria para reducir la producción de antígeno en un 50%, resultó ser 88 veces mayor que la del fragmento Fab (1,064nM para el fragmento Fab *versus* 0,012 nM para el AcM) (Figura 4.5). Por tanto, la bivalencia del AcM 101F, aunque no es imprescindible para neutralizar al virus, parece contribuir a aumentar la capacidad neutralizante de ese anticuerpo.

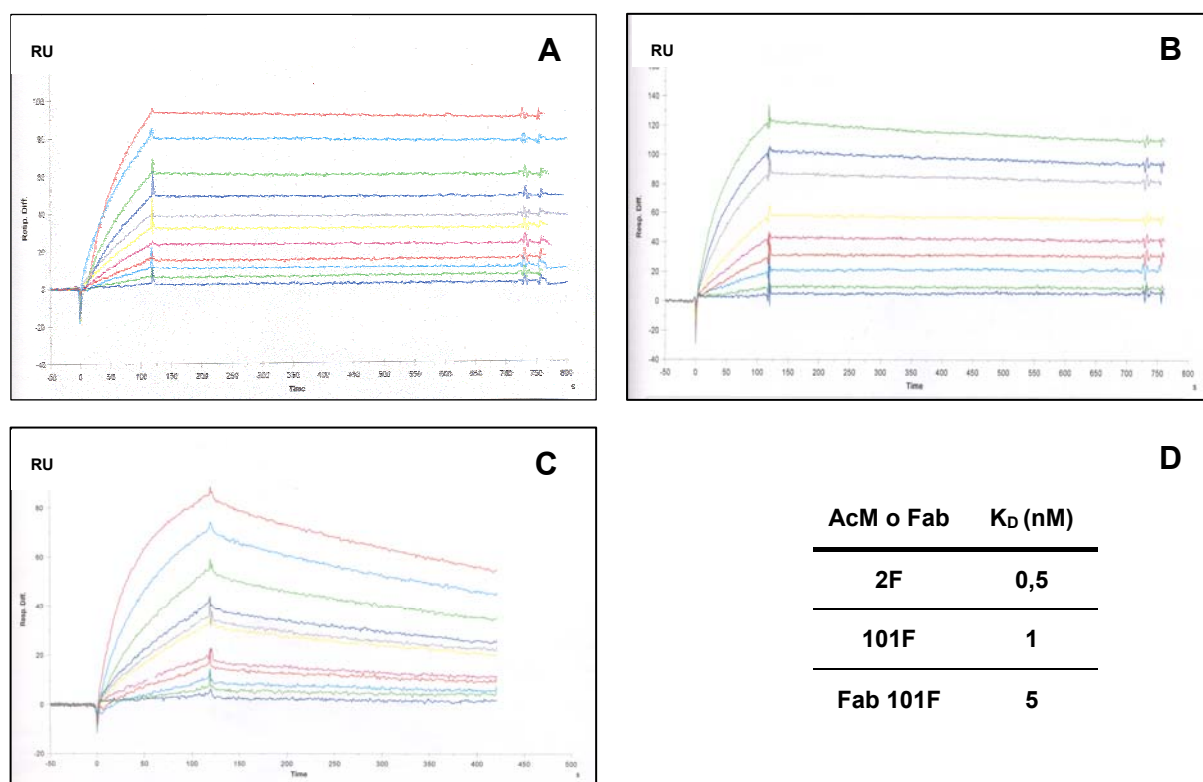


Figura 4.6. Sensogramas de la unión y disociación de los AcMs 2F (A) y 101F (B) y del fragmento 101Fab (C) a la proteína F_{TM-NN} del VRSH, y valores de las K_D obtenidas (D). A tiempo cero se empezaron a pasar las soluciones conteniendo diluciones de los distintos anticuerpos y fragmento Fab en tampón HBS-EP y 120 segundos más tarde se volvió a pasar tampón solamente. Las curvas muestran los cambios en el índice de refracción representado en unidades arbitrarias (RU) en función del tiempo. En la tabla D se muestra el valor de la constante de afinidad (K_D) obtenida para cada anticuerpo o fragmento Fab.

Por tanto, y como resumen de todo el apartado 4.1, se puede decir que: i) los anticuerpos altamente neutralizantes dirigidos contra la proteína F del VRSH ejercen su actividad inhibidora interaccionando con una forma de dicha proteína, presumiblemente en su estado pre-fusión, presente en la partícula viral, antes de que ésta entre en contacto con la célula, ii) los anticuerpos parcialmente neutralizantes ejercen su acción en una etapa posterior a la interacción del virus con

la superficie celular, iii) las diferencias entre los anticuerpos altamente y parcialmente neutralizantes no se deben a diferentes afinidades por el antígeno y iv) los fragmentos Fab de anticuerpos altamente neutralizantes son capaces también de neutralizar al virus, aunque menos eficientemente que el correspondiente anticuerpo del que derivan.

4.2. NEUTRALIZACIÓN DEL VRSH POR PÉPTIDOS DERIVADOS DE LAS REGIONES HEPTÁDICAS DE LA PROTEÍNA F Y POR COMPUESTOS DE BAJO PESO MOLECULAR

Como se ha mencionado en la Introducción existen otros agentes inhibidores de la fusión de membranas promovida por las proteínas F de los paramixovirus, tales como péptidos y compuestos de bajo peso molecular. Se ha descrito que péptidos derivados de las regiones heptádicas de la proteína F de los paramixovirus, o de proteínas con actividad análoga de fusión de otros virus con envuelta, inhiben la infectividad viral, presumiblemente inhibiendo la formación del haz de seis α -hélices formado por las regiones heptádicas A y B (RHA y RHB) de ese tipo de proteínas (Figura 1.10) (Lambert y col., 1996; Chan y Kim, 1998; Wang y col., 2003).

También hay una serie de compuestos de bajo peso molecular, en fase de desarrollo clínico, que inhiben la infectividad del VRSH (Huntley y col., 2002; Cianci y col., 2004a,b,c; Douglas y col., 2005). Algunos de estos compuestos inhiben la fusión virus-célula al unirse, aparentemente, a un dominio hidrofóbico localizado en la superficie de las α -hélices de la RHA impidiendo así la formación del haz de seis α -hélices. Es decir, el mecanismo de neutralización por este tipo de compuestos sería similar al de los péptidos derivados de las regiones heptádicas.

Con el fin de comparar el mecanismo de neutralización por anticuerpos anti-F y moléculas pequeñas que tienen como diana la proteína F, se utilizaron péptidos que contenían secuencias parciales de las regiones heptádicas A y B (Tabla 3.1.2, Figura 4.7A) y compuestos de bajo peso molecular derivados del benziimidazol con acción antiviral (BMS-433771, A-76967, A-77137) (Figura 3.1.3). En la Figura 4.7B se observa como los péptidos derivados de la RHB neutralizaron al VRSH, ya que según se aumentó la cantidad de péptido en el ensayo, disminuyó la cantidad de

antígeno viral producido, al igual que con el AcM 47F que se incluyó como control positivo de neutralización. Sin embargo, los péptidos derivados de la RHA no inhibieron la infectividad viral a las concentraciones ensayadas. La mayor capacidad neutralizante del péptido F478-516 (azul) respecto a los péptidos F478-512 (verde) y F488-522 (rosa), puede tener relación con su mayor longitud, ya que péptidos de la RHB más cortos no son capaces de inhibir la infectividad viral (C.Palomo, comunicación personal).

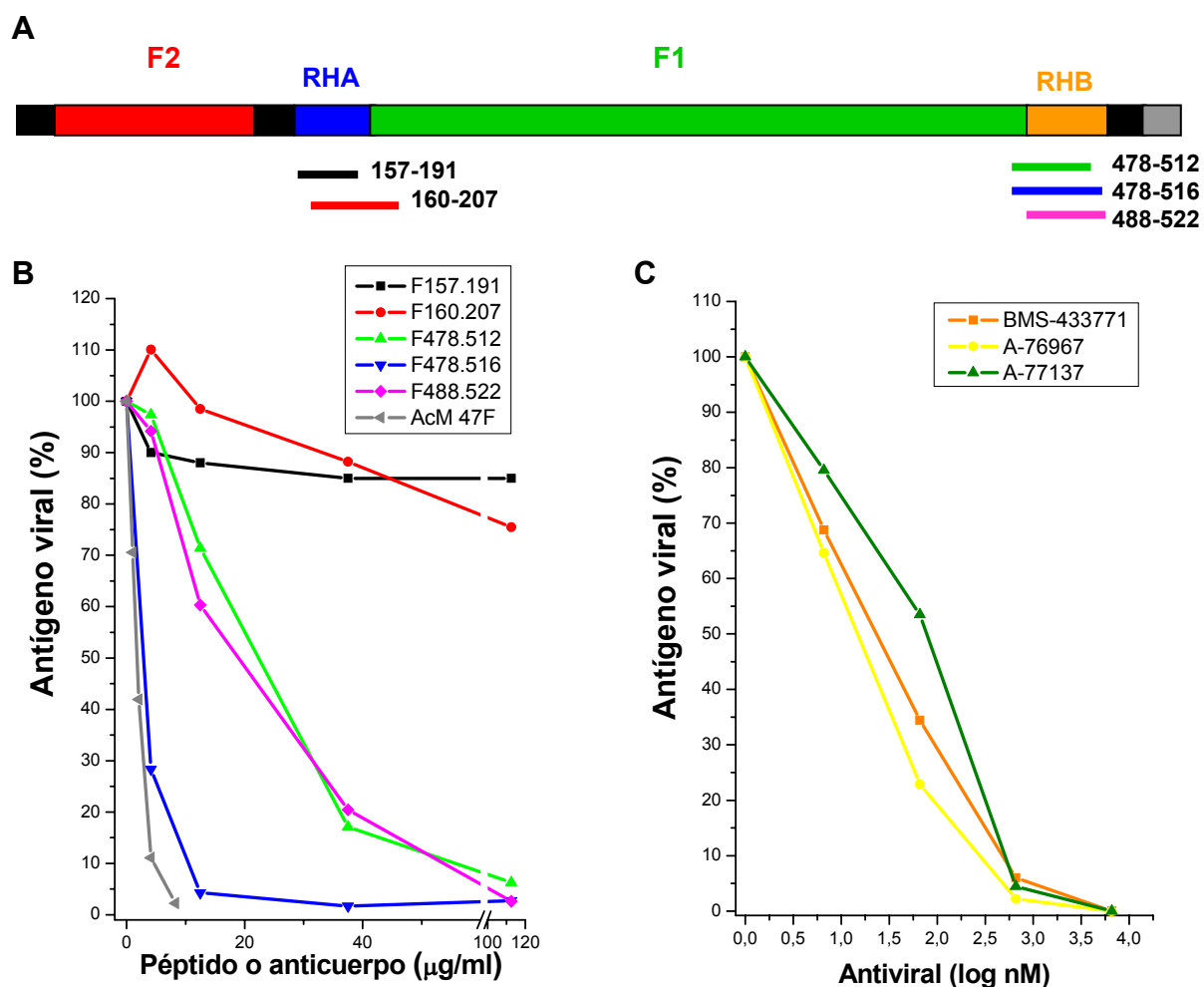


Figura 4.7. Representación esquemática de la posición de péptidos de las RHA y RHB en la proteína F del VRSH (A) y capacidad neutralizante de estos péptidos (B) y de compuestos de bajo peso molecular (C). A: Se representa en la estructura primaria de la proteína F la posición de los péptidos derivados de las RHA y RHB: **F157-191** y **F160-207** en la RHA, **F478-512**, **F478-516** y **F488-522** en la RHB. Los números de los péptidos indican la posición del primero y último de sus aminoácidos en la proteína F del VRSH. B, C: Células HEp-2 se infectaron con 1×10^3 ufp de la cepa Long del VRSH en presencia de distintas cantidades de los péptidos (panel B) o de los compuestos indicados (panel C). En el panel B se incluyó el AcM 47F como control de la neutralización. La infectividad viral se cuantificó por la cantidad de antígeno viral producido a las 72 horas y se representa como el porcentaje del valor obtenido en ausencia de agente inhibidor (apartado 3.2.4.3A de Métodos).

De manera análoga a los péptidos derivados de la RHB, los tres compuestos de bajo peso molecular ensayados inhibieron la infectividad viral (Figura 4.7C), así al aumentar la cantidad de cada compuesto añadido al ensayo, se observó una disminución gradual de la cantidad de antígeno viral producido

Los resultados presentados hasta el momento indican que péptidos derivados de la RHB y los compuestos de bajo peso molecular ensayados neutralizan eficientemente al virus si están presentes cuando el virus se añade a las células en cultivo, al igual que los AcMs 47F y 101F. En el apartado anterior se vió que estos anticuerpos son capaces de neutralizar al virus antes de que éste entre en contacto con las células. Para analizar si los inhibidores de la Figura 4.7 son también capaces de neutralizar al virus en esas condiciones, se seleccionaron el péptido F478-516 (RHB) y el compuesto BMS-433771. Así, la cepa Long del VRSH se incubó en presencia o ausencia de cantidades saturantes del péptido o del antiviral (determinadas a partir de los resultados de la Figura 4.7) antes de someterlo a ultracentrifugación, como se describió en el apartado 4.1.1 para los AcMs (ver Figura 4.2). La infectividad presente en los sedimentos se cuantificó infectando con ellos células y midiendo la cantidad de antígeno viral producido a las 72 horas post-infección. Una parte del virus incubado sin inhibidor y ultracentrifugado, se añadió a las células en presencia de los inhibidores (Figura 4.2b2) para comprobar que todavía era sensible a la neutralización por los mismos.

En la Figura 4.8A, se observa que el péptido F478-516 y el antiviral BMS-433771 no inhibieron la infectividad del virus cuando se preincubaron con éste antes de la ultracentrifugación (Figura 4.8A), sino que el péptido y el compuesto antiviral necesitaron estar presentes durante la infección para neutralizarlo como se deduce de los resultados de la Figura 4.8B. Por el contrario, la infectividad viral quedó casi totalmente inhibida tras la incubación del virus con el AcM 47F, antes de la ultracentrifugación (como se había observado anteriormente, Figura 4.3A).

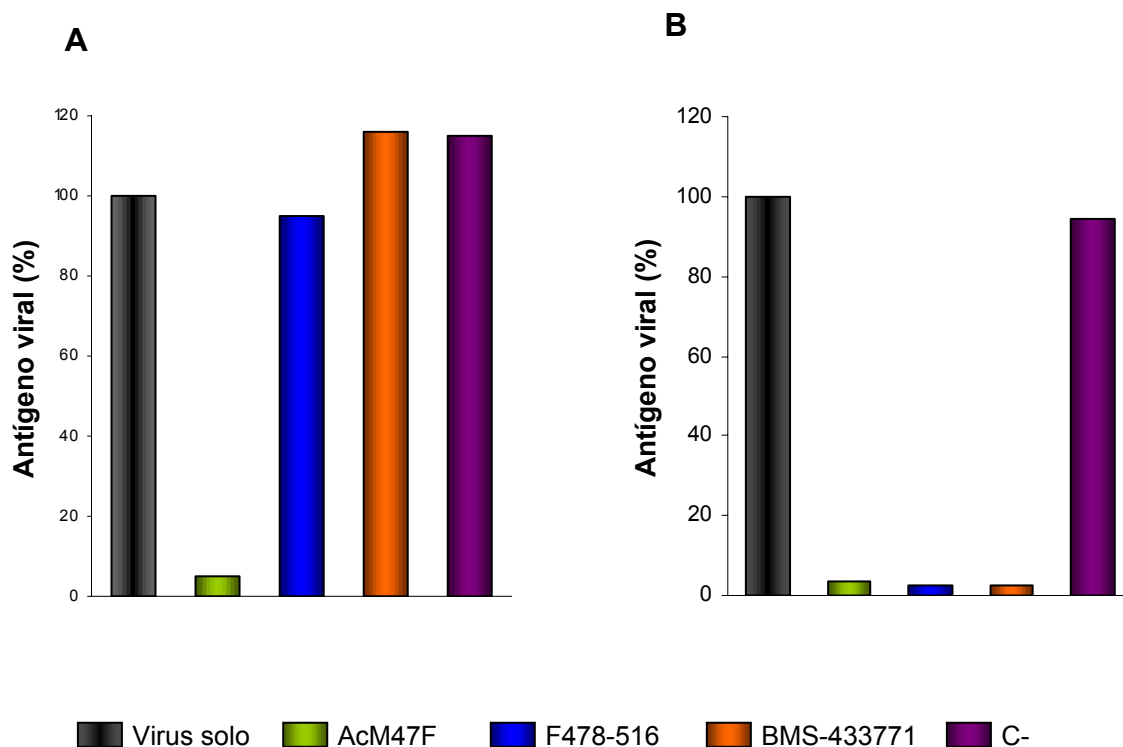


Figura 4.8. Comparación de la capacidad neutralizante del AcM 47F, del péptido F478-516 y del compuesto de bajo peso molecular BMS-433771 antes (A) o durante (B) la infección con la cepa Long del VRSH. A: $8,2 \times 10^5$ ufp de virus se incubaron durante 30 minutos a 37°C en ausencia o en presencia de $800\mu\text{g/ml}$ de AcM 47F, $1300\mu\text{g/ml}$ de péptido F478-516 o $250\mu\text{M}$ de BMS-433771, tal como se indica por los distintos colores antes de someterse a ultracentrifugación (35.000rpm , 2 horas). La infectividad presente en el sedimento se cuantificó tras infectar las células como se describe en el apartado 3.2.4.3B. **B:** 1×10^5 ufp de virus ultracentrifugado en ausencia de inhibidor se incubó con $20\mu\text{g/ml}$ de AcM 47F, $33\mu\text{g/ml}$ de péptido F478-516 o $2\mu\text{M}$ de BMS-433771 y la mezcla se añadió directamente a las células, como se describe en el apartado 3.2.4.3A. La infectividad viral se cuantificó midiendo la cantidad de antígeno viral producido a las 72 horas y se representa como el porcentaje del valor obtenido en ausencia de inhibidor (barra negra). Como control negativo de la neutralización se usó una preparación de inmunoglobulinas de ratones no inmunizados (barra morada).

Por tanto, los resultados presentados en los apartados 4.1 y 4.2 indican que los AcMs 47F y 101F, el péptido F478-516 y el compuesto de bajo peso molecular BMS-433771 neutralizan totalmente al virus. Sin embargo, mientras que el péptido de la RHB y el compuesto antiviral requieren estar presentes en el momento de la infección, los AcMs 47F y 101F pueden neutralizar al virus antes de que éste entre en contacto con la célula.

4.3. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES QUE RECONOCEN CONFORMACIONES DISTINTAS DE LA PROTEÍNA F DEL VRSH

En los apartados anteriores se ha descrito que AcMs anti-F, péptidos derivados de la RHB de la proteína F y compuestos de bajo peso molecular neutralizan la infectividad del virus al bloquear la fusión de las membranas viral y celular en momentos diferentes del proceso de fusión, por lo que presumiblemente se unen a conformaciones distintas de la proteína F.

En el laboratorio se habían caracterizado anticuerpos dirigidos frente al virus respiratorio sincitial humano (VRSH) presentes en dos preparaciones comerciales de inmunoglobulinas (Igs) humanas (Respigam[®] y Flebogamma[®]) (Sastre y col., 2004). Cuando se eliminaron de dichas preparaciones los anticuerpos anti-F_{TM-} y anti-G por cromatografía de afinidad, los anticuerpos remanentes aún neutralizaban eficientemente al VRSH, y reconocían a la proteína F expresada en la membrana de células infectadas con el VRSH o con un virus vaccinia recombinante que expresaba la proteína F completa (VAC/F_C). Es decir, en dichas preparaciones de Igs había anticuerpos neutralizantes que reconocían a una/s conformación/es de la proteína F distinta/s de la conformación que adquiere la forma soluble F_{TM-} de la proteína F (Sastre y col., 2005)

Con el fin de obtener anticuerpos neutralizantes que reconociesen distintas conformaciones de la proteína F, se inmunizaron conejos con un virus vaccinia recombinante que expresa la forma completa de la proteína F (VAC/F_C); es decir, anclada a la membrana.

4.3.1. Inmunización de conejos con virus VAC/F_C y purificación de anticuerpos del suero anti-VAC/F_C

Se inmunizaron conejos con 1×10^7 ufp del virus VAC/F_C por vía intramuscular (i.m) para obtener sueros anti-VAC/F_C (apartado 3.2.1). Una vez que se comprobó por ELISA la presencia en el suero de anticuerpos anti-F_{TM-} (Figura 4.9A) y la capacidad de neutralizar al VRSH (Figura 4.9B), los anticuerpos de los sueros se

purificaron por cromatografía de afinidad empleando una columna de proteína A-Sepharosa. Seguidamente, se comprobó que los anticuerpos eluidos de la columna (anti- F_C) reconocía a la proteína F_{TM} - en ELISA y neutralizaba al VRSH al igual que el suero de partida (Figura 4.9).

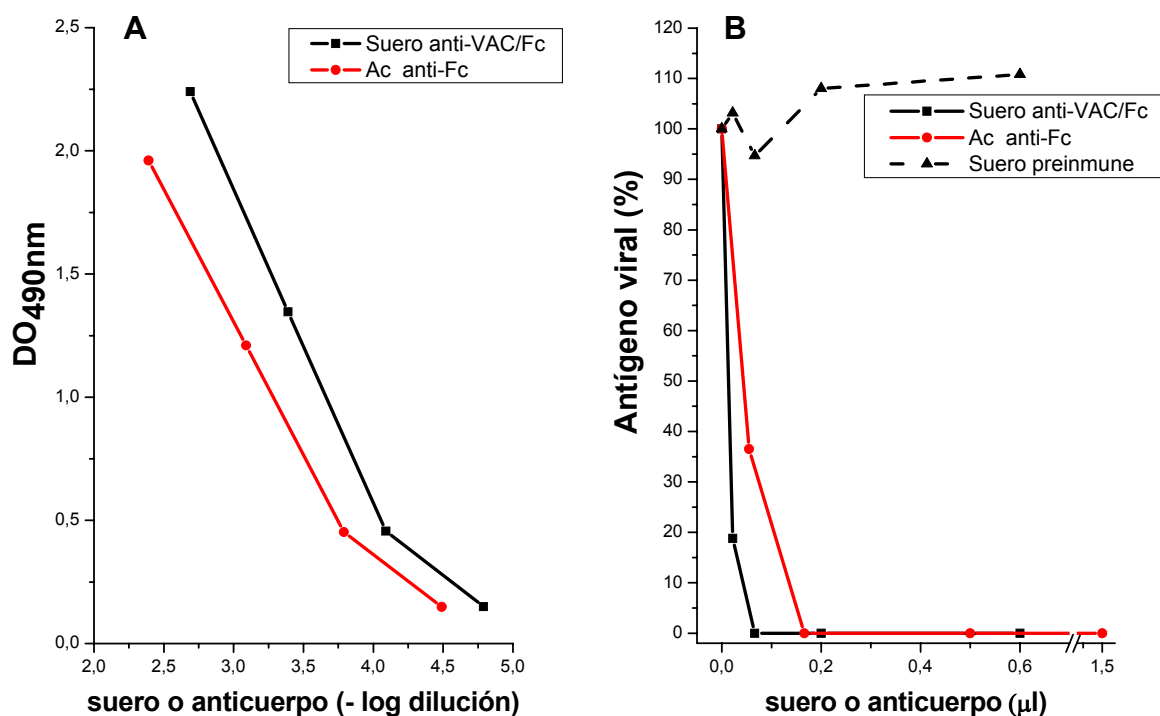


Figura 4.9. Titulación por ELISA (A) y capacidad neutralizante (B) de los anticuerpos obtenidos a partir del suero de conejos inmunizados con virus VAC/ F_C **A:** Diluciones seriadas del suero anti-VAC/ F_C y de los anticuerpos purificados del mismo (anti- F_C) se ensayaron por ELISA frente a la proteína F_{TM} -purificada **B:** Células HEP-2 se infectaron con $6,5 \times 10^3$ ufp de la cepa Long del VRSH preincubado durante 30 minutos a 37°C con diluciones del suero anti-VAC/ F_C y de los anticuerpos purificados anti- F_C . La mezcla se empleó para infectar las células y la infectividad viral se cuantificó midiendo la cantidad de antígeno viral producido a las 72 horas, representada como el porcentaje del valor obtenido en ausencia de anticuerpo. Como control negativo de la neutralización se utilizó el suero preinmune del conejo.

4.3.2. Depleción de los anticuerpos anti- F_{TM} - de los anticuerpos anti- F_C

Para comprobar, si al igual que ocurre en preparaciones comerciales de inmunoglobulinas humanas, en el suero de los conejos inmunizados con virus VAC/ F_C había anticuerpos neutralizantes que reconociesen distintas conformaciones de la proteína F del VRSH, se deplecionó la fracción anti- F_{TM} - de los anticuerpos anti- F_C . Para ello, se empleó una columna de Sepharosa que tenía acoplada

covalentemente la proteína F_{TM^-} que, como se ha mencionado anteriormente, es una forma soluble de la proteína F que presumiblemente adopta la conformación post-fusión de esa proteína.

Los anticuerpos anti- F_C se pasaron por la columna de Sepharosa- F_{TM^-} . El material retenido en la columna se eluyó a pH ácido obteniéndose así los anticuerpos anti- F_{C/TM^-} que reconocen a la proteína F_{TM^-} . La fracción no retenida en la columna (NR) se pasó por ésta un total de 5 veces hasta que no se eluyeron más anticuerpos anti- F_{C/TM^-} (Figura 4.10A). Para comprobar la eliminación de anticuerpos anti- F_{C/TM^-} en el material no retenido, se ensayaron el material de partida (anti- F_C), el no retenido (NR) y el eluido de la columna (anti- F_{C/TM^-}) en un ELISA directo utilizando la proteína F_{TM^-} purificada como antígeno. En la Figura 4.10B, se observa como en el material NR (denominado anti- $F_{C/\Delta TM^-}$) no existen anticuerpos que reconozcan a la proteína F_{TM^-} , al contrario que en el material de partida anti- F_C y en el eluido anti- F_{C/TM^-} . A partir del resultado obtenido en este ELISA, se estima que aproximadamente el 20% de los anticuerpos totales presentes en la preparación anti- F_C , reconocen a la proteína F_{TM^-} , ya que para obtener la misma reactividad con el antígeno se necesitan 5 veces más de anticuerpos totales anti- F_C que de anticuerpos anti- F_{C/TM^-} , específicos de la proteína F_{TM^-} .

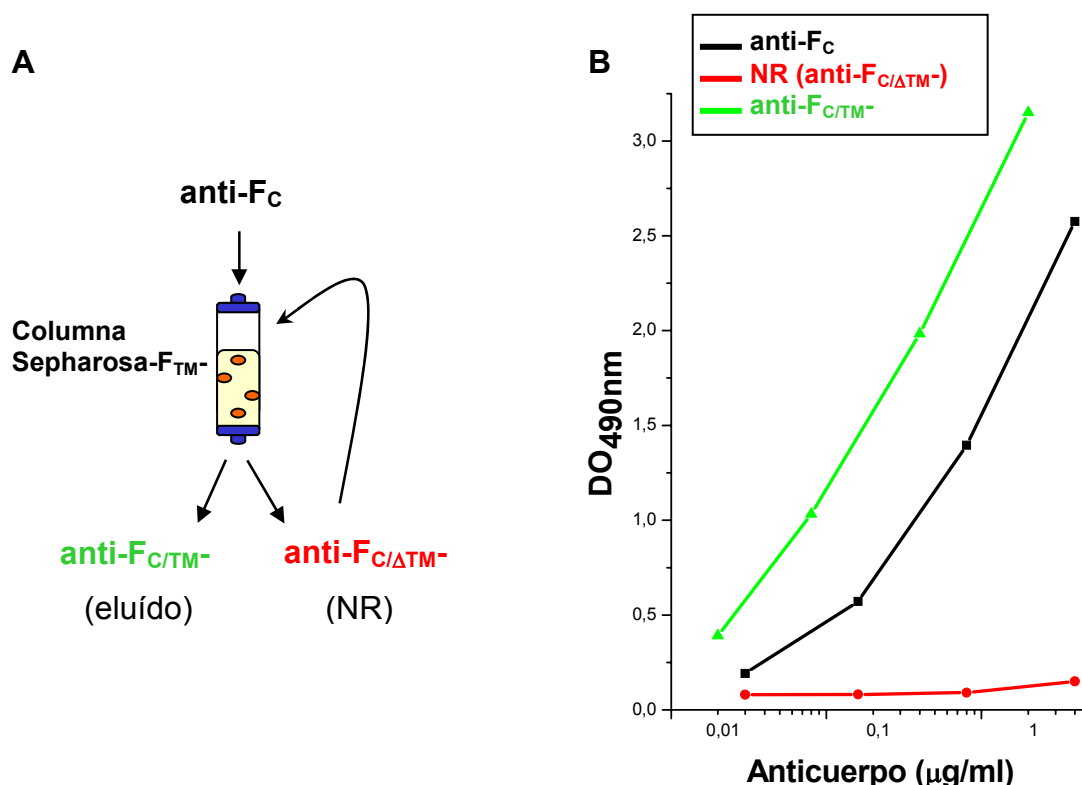


Figura 4.10. Esquema de la cromatografía en una columna de Sepharosa-F_{TM}- (A) y titulación en ELISA de las fracciones de anticuerpos obtenidas del suero anti-VAC/F_C tras la cromatografía (B). A: Esquema de la depleción de anticuerpos anti-F_{TM}- por cromatografía en una columna de Sepharosa-F_{TM}- como se describe en el apartado 3.2.3.5. B: Diluciones seriadas del material de partida (anti-F_C), del material no retenido (NR, anti-F_{C/ΔTM}-) y del material eluido (anti-F_{C/TM}-) se ensayaron frente a la proteína F_{TM}- purificada en un ELISA directo.

4.3.3. Capacidad neutralizante de los anticuerpos anti-F_C

Una vez comprobado que el material anti-F_{C/ΔTM}- no retenido en la columna de Sepharosa-F_{TM}- carece de anticuerpos que reconozcan a la proteína F_{TM}-, se analizó la capacidad neutralizante de las distintas fracciones de la cromatografía cuantificando la cantidad de antígeno viral producido cuando la infección se llevó a cabo con virus en presencia de cada una de las fracciones.

En la Figura 4.11 se observa que al igual que ocurría en las preparaciones de inmunoglobulinas humanas mencionadas anteriormente, la fracción anti-F_{C/ΔTM}-, aún careciendo de anticuerpos que reconozcan a la proteína F_{TM}-, es capaz de neutralizar al virus tan eficientemente como el material de partida anti-F_C. Los anticuerpos purificados anti-F_{C/TM}- que reconocen a la conformación post-fusión de la

proteína, también neutralizan al virus, ya que al aumentar la cantidad de anticuerpo disminuye la cantidad de antígeno viral producido. Sin embargo, los anticuerpos anti-F_{C/TM}⁻ son menos eficientes en la neutralización que los anticuerpos anti-F_C, puesto que a igualdad de masa de anticuerpo en el ensayo, la fracción anti-F_{C/TM}⁻ representa anticuerpos purificados específicos de la proteína F, mientras que en los anticuerpos totales anti-F_C sólo un 20% aproximadamente reconocen a la proteína F_{TM}⁻, según se estimó en el apartado 4.3.2.

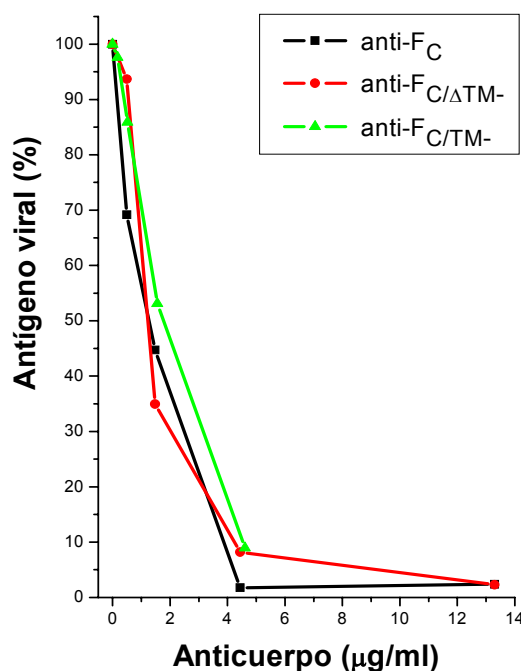


Figura 4.11. Ensayo de neutralización de las fracciones de anticuerpos obtenidas tras la cromatografía en columnas de Sepharosa-F_{TM}⁻ de los anticuerpos obtenidos del suero anti-VAC/Fc. Células HEp-2 se infectaron con $6,5 \times 10^3$ ufp de la cepa Long del VRSH preincubado 30 minutos a 37°C con distintas cantidades de cada anticuerpo indicado en la Figura. Con la mezcla de virus y anticuerpo se infectaron las células. A las 72 horas post-infección, se cuantificó la infectividad viral por la cantidad de antígeno viral producido representada como el porcentaje del valor obtenido en ausencia de anticuerpo

Como se describió en el apartado 4.1.1, ciertos anticuerpos neutralizan al VRSH antes de entrar en contacto con la célula. Con el objeto de comprobar si en estas preparaciones existen anticuerpos de este tipo, se hizo un ensayo de neutralización similar al de la Figura 4.2. El virus se incubó en ausencia o presencia de anticuerpo y tras someterse a ultracentrifugación, para separar el virus de los

anticuerpos no unidos a las partículas virales, se añadieron diluciones seriadas de los sedimentos respectivos a las células y se cuantificó la producción de antígeno viral a las 72 horas por ELISA.

En la Figura 4.12, se observa que el título de los virus ultracentrifugados en ausencia de anticuerpo o en presencia de un suero preinmune control eran muy parecidos. Por el contrario, el título de los virus preincubados con los anticuerpos anti- F_C , anti- $F_{C/\Delta TM^-}$ o anti- F_{C/TM^-} se redujo a valores negligibles dentro del rango de diluciones ensayadas. Por lo tanto, todas estas preparaciones de anticuerpos fueron capaces de neutralizar al virus antes de la ultracentrifugación; es decir, antes de que el virus entrara en contacto con las células y, por tanto, antes de que la proteína F de las partículas virales se activase para la fusión de membranas.

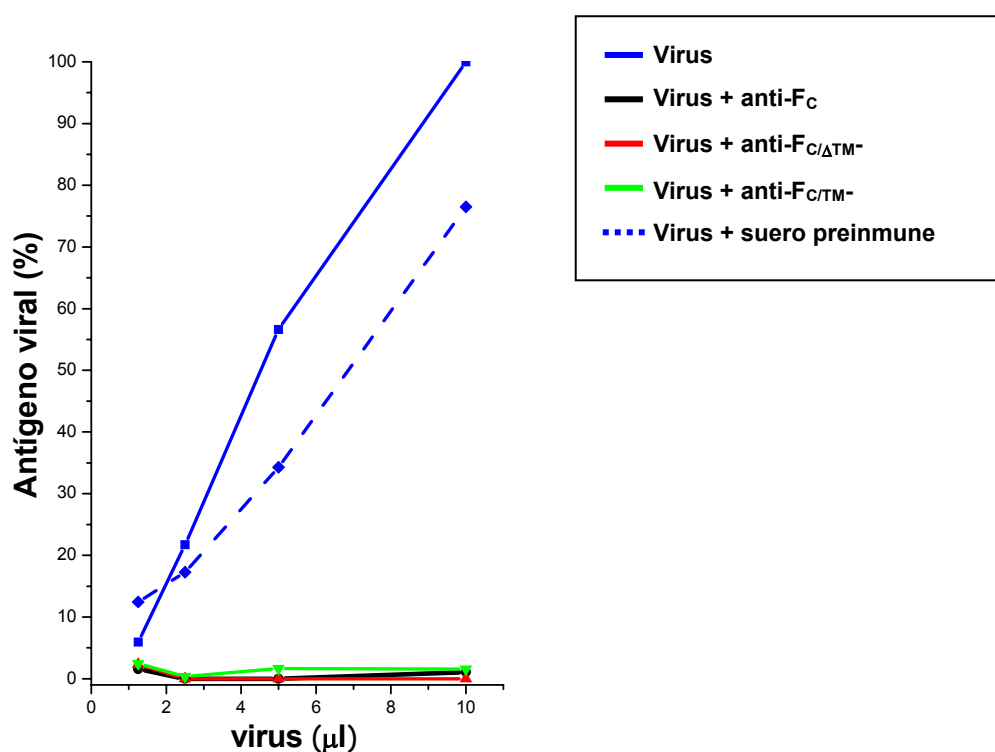


Figura 4.12. Ensayo de neutralización del VRSH ultracentrifugado en presencia de anticuerpos anti- F_C . $1,3 \times 10^6$ ufp de virus se preincubaron en ausencia o en presencia de anti- F_C o anti- $F_{C/\Delta TM^-}$ (800 μg/ml) y anti- F_{C/TM^-} (180 μg/ml). Posteriormente, se sometieron a ultracentrifugación. Diluciones del virus presente en los sedimentos se añadieron a las células como se describe en el apartado 3.2.4.3B. A las 72 horas post-infección, se cuantificó la infectividad viral midiendo la cantidad de antígeno viral producido representada como el porcentaje del valor obtenido en ausencia de anticuerpo. Como control negativo de la neutralización se utilizó el suero preinmune del conejo.

El hecho de que los anticuerpos anti- F_{C/TM^-} retenidos en la columna de Sepharosa- F_{TM^-} también neutralicen al virus en este ensayo indica que la conformación post-fusión de la proteína F y la conformación pre-fusión deben compartir epítopos. Esta hipótesis se comprobó por ELISA indirecto, donde se utilizaron los anticuerpos anti- F_{C/TM^-} para capturar la proteína F de un extracto de células infectadas con el VRSH. Posteriormente, se añadieron los anticuerpos anti- $F_{C/\Delta TM^-}$ marcados con biotina. Estos anticuerpos no reconocen a la conformación post-fusión de la proteína F, representada por la proteína F_{TM^-} , por lo que la reactividad obtenida (Figura 4.13), indica que en un extracto de células infectadas con el VRSH existe/n forma/s de la proteína F que son reconocidas a la vez por ambos anticuerpos anti- F_{C/TM^-} y anti- $F_{C/\Delta TM^-}$.

No obstante, no se puede excluir que ambas formas de la proteína F (pre- y post-fusión) se encuentren en la membrana viral y que en la preparación anti- F_{C/TM^-} existan además anticuerpos que reconozcan exclusivamente a la forma post-fusión y que neutralicen al virus por algún mecanismo de impedimento estérico, de forma que la unión de esos anticuerpos a formas post-fusión de la proteína F bloquee la activación de moléculas vecinas de proteína F en la forma pre-fusión.

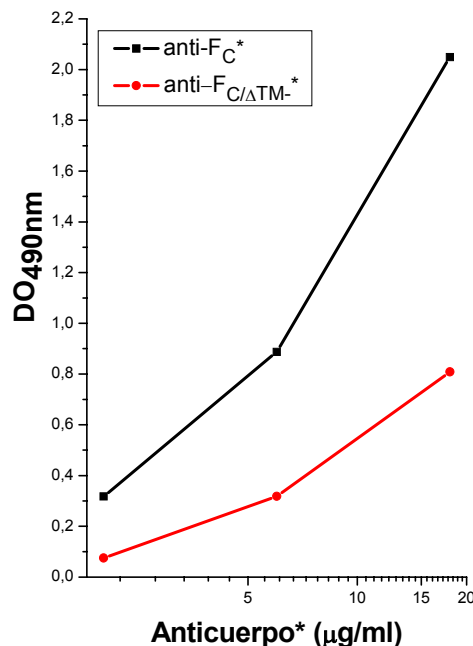


Figura 4.13. Reactividad de anticuerpos anti- F_C y anti- $F_{C/\Delta TM^-}$ con la proteína F de extractos capturada con anti- F_{C/TM^-} en un ELISA indirecto. Diluciones seriadas de los anticuerpos anti- F_C^* y anti- $F_{C/\Delta TM}^*$ biotinilados (representados por un asterisco) se ensayaron con un extracto de células infectadas con el VRSH en un ELISA indirecto donde se empleó como anticuerpo de captura la fracción anti- F_{C/TM^-} tal y como se describe en el apartado 3.2.4.1B.

4.3.4. Unión de los anticuerpos anti- F_C a la proteína F expresada en la membrana de células infectadas con el VRSH

Una vez comprobado que en el suero anti-VAC/ F_C existen anticuerpos que no reconocen a la proteína F_{TM^-} pero que, sin embargo, son capaces de neutralizar eficientemente al virus, se ensayó por citometría de flujo si los anticuerpos anti- $F_{C/\Delta TM^-}$ reconocen a la proteína F expresada en la membrana de células infectadas con el VRSH. Para ello, células HEp-2 se infectaron con la cepa Long del VRSH. A las 24 horas post-infección, se incubaron con distintos anticuerpos y la unión de éstos a las células infectadas se cuantificó por citometría de flujo. En la Figura 4.14, se muestran 3 paneles correspondientes a la unión de los anticuerpos anti- F_C (A, negro), anti- $F_{C/\Delta TM^-}$ (B, rojo) y anti- F_{C/TM^-} (C, verde) a células infectadas con el VRSH. En los 3 paneles, la nube de puntos de color gris corresponde a la unión de los anticuerpos a células sin infectar (mock). Todos los anticuerpos reconocieron a la proteína F expresada en la membrana de células infectadas con el VRSH como se observa por el desplazamiento de la población celular hacia valores más altos de fluorescencia respecto al control negativo de células sin infectar (color gris).

Las células reconocidas por los anticuerpos anti- $F_{C/\Delta TM^-}$ presentaron valores más bajos de fluorescencia que las reconocidas por los anticuerpos anti- F_C y anti- F_{C/TM^-} , lo que sugiere que la conformación de la proteína F reconocida por los anticuerpos anti- $F_{C/\Delta TM^-}$ es menos abundante en la superficie de células infectadas por el VRSH que la reconocida por los anticuerpos anti- F_{C/TM^-} .

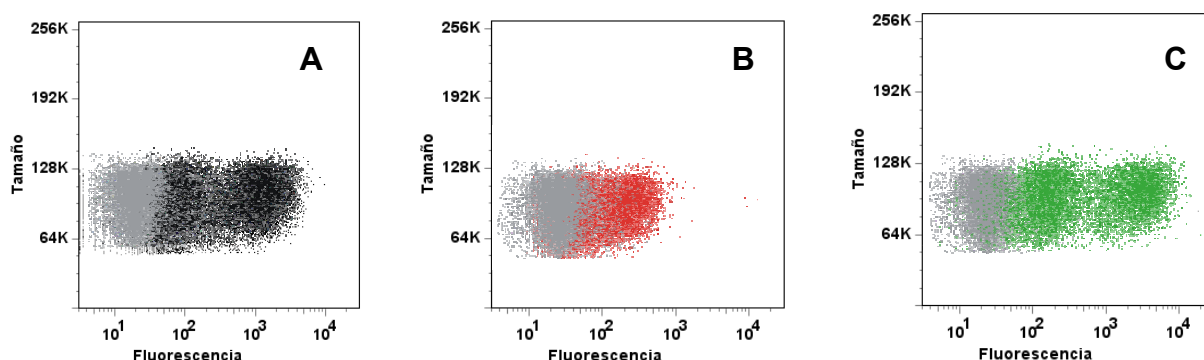


Figura 4.14. Ensayo por citometría de flujo de la unión de los anticuerpos anti- F_C (A), anti- $F_{C/\Delta TM^-}$ (B) y anti- F_{C/TM^-} (C) a células infectadas con el VRSH. Células HEp-2 se infectaron con la cepa Long a una moi de 1 ufp/célula. A las 24 horas post-infección, se despegaron las células y se incubaron con 1 μ g de anti- F_C (A), 1 μ g de anti- $F_{C/\Delta TM^-}$ (B) o 500 ng de anti- F_{C/TM^-} (C) y se midió su unión por citometría de flujo como se indica en el apartado 3.2.4.2 de Métodos. En todos los casos la nube de puntos de color gris corresponde a la citometría de células sin infectar incubadas con los anticuerpos correspondientes.

4.3.5. Caracterización de los anticuerpos anti-F_C deplecionados de los anticuerpos que se unen a células infectadas con el virus VAC/P

Como los anticuerpos anti-F_C se obtuvieron por inmunización de conejos con un virus VAC/F_C, lo más probable es que en la superficie de células infectadas por el VRSH estén reconociendo a la proteína F. En todo caso, y para confirmar su unión a moléculas de proteína F y no a otros componentes del VRSH, se analizó la unión de los anticuerpos anti-F_C, anti-F_{C/ΔTM⁻} y anti-F_{C/TM⁻} a células infectadas con un virus vaccinia recombinante en el que la proteína F es la única específica del VRSH. Para ello se eliminaron previamente los anticuerpos anti-vaccinia (anti-VAC) mediante la adsorción de las distintas preparaciones de anticuerpos a células infectadas con el virus VAC/P (virus vaccinia recombinante que expresa la fosfoproteína (P) del VRSH). Así, células HEp-2 se infectaron con el virus VAC/P y, tras 24 horas, se despegaron y se incubaron con los anticuerpos anti-F_C, anti-F_{C/ΔTM⁻} y anti-F_{C/TM⁻}, según se describe en el apartado 3.2.3.6, para obtener los correspondientes materiales carentes de anticuerpos anti-VAC: anti-F_{C/ΔVAC}, anti-F_{C/ΔTM⁻/ΔVAC} y anti-F_{C/TM⁻/ΔVAC}.

En primer lugar, se comprobó por ELISA que se habían eliminado los anticuerpos que reconocen a antígenos del virus vaccinia. Como se observa en la Figura 4.15A, tras la adsorción a células infectadas con el virus VAC/P (líneas discontinuas) los anticuerpos anti-VAC se perdieron de todas las preparaciones de anticuerpos ensayadas. Sin embargo, como se observa en la Figura 4.15B, al ensayar la unión frente a la proteína F_{TM⁻} purificada, los anticuerpos anti-F_{C/ΔVAC} y anti-F_{C/TM⁻/ΔVAC} mantuvieron su reactividad con dicha proteína.

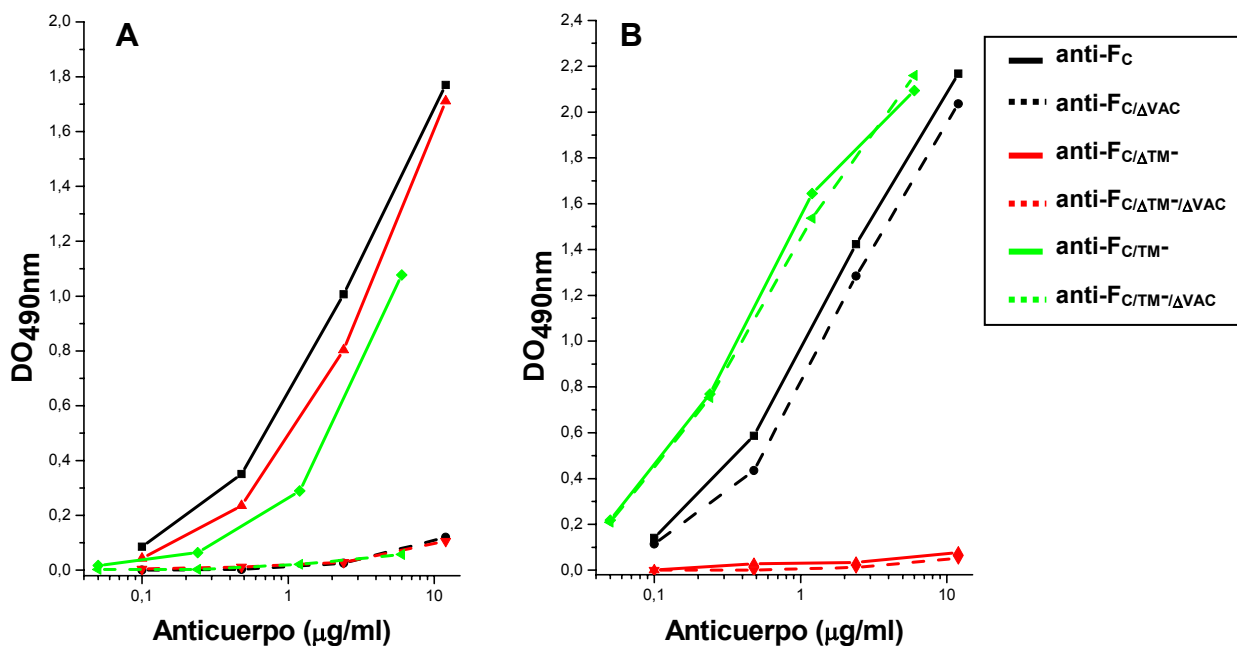


Figura 4.15. Titulación por ELISA directo de los anticuerpos anti-F_C, anti-F_{C/ΔTM-} y anti-F_{C/TM-} antes o después de la adsorción a células infectadas con el virus VAC/P. En el panel **A** se muestra la unión de los anticuerpos indicados a un extracto de células HEP-2 infectadas con el virus VAC/P. En el panel **B** se muestra la unión de los mismos anticuerpos a la proteína F_{TM} purificada. Los anticuerpos de partida (línea continua) y sus correspondientes deplecionados de anticuerpos anti-VAC (línea discontinua) se muestran con el mismo color.

Seguidamente, se ensayó por citometría de flujo, la unión de los anticuerpos carentes de anticuerpos anti-VAC, a la superficie de células infectadas con el virus VAC/F_C. En la Figura 4.16 se muestran seis paneles, correspondiendo cada uno a la unión de un tipo de anticuerpo. En cada panel, por medio de tres histogramas, se representa la unión de los anticuerpos a células sin infectar (gris), células infectadas con el virus VAC/P (azul) y células infectadas con el virus VAC/F_C (histograma de un color distinto para cada anticuerpo). Los anticuerpos anti-F_C (panel A), anti-F_{C/ΔTM-} (panel B), y anti-F_{C/TM-} (panel C) se unieron a la superficie de células infectadas con el virus VAC/P o VAC/F_C. Sin embargo, cuando se eliminaron los anticuerpos anti-VAC, los anticuerpos anti-F_{C/ΔVAC} (panel D), anti-F_{C/ΔTM-/ΔVAC} (panel E), y anti-F_{C/TM-/ΔVAC} (panel F), perdieron en gran medida su capacidad de unirse a células infectadas con el virus VAC/P, reflejado en un desplazamiento de los histogramas de color azul hacia valores menores de fluorescencia, próximos a los correspondientes a células sin infectar (gris). Por el contrario, los distintos anticuerpos deplecionados de anticuerpos anti-VAC retuvieron casi inalterada su capacidad de unión a la

superficie de células infectadas con el virus VAC/F_C (paneles D, E y F, histogramas vacíos).

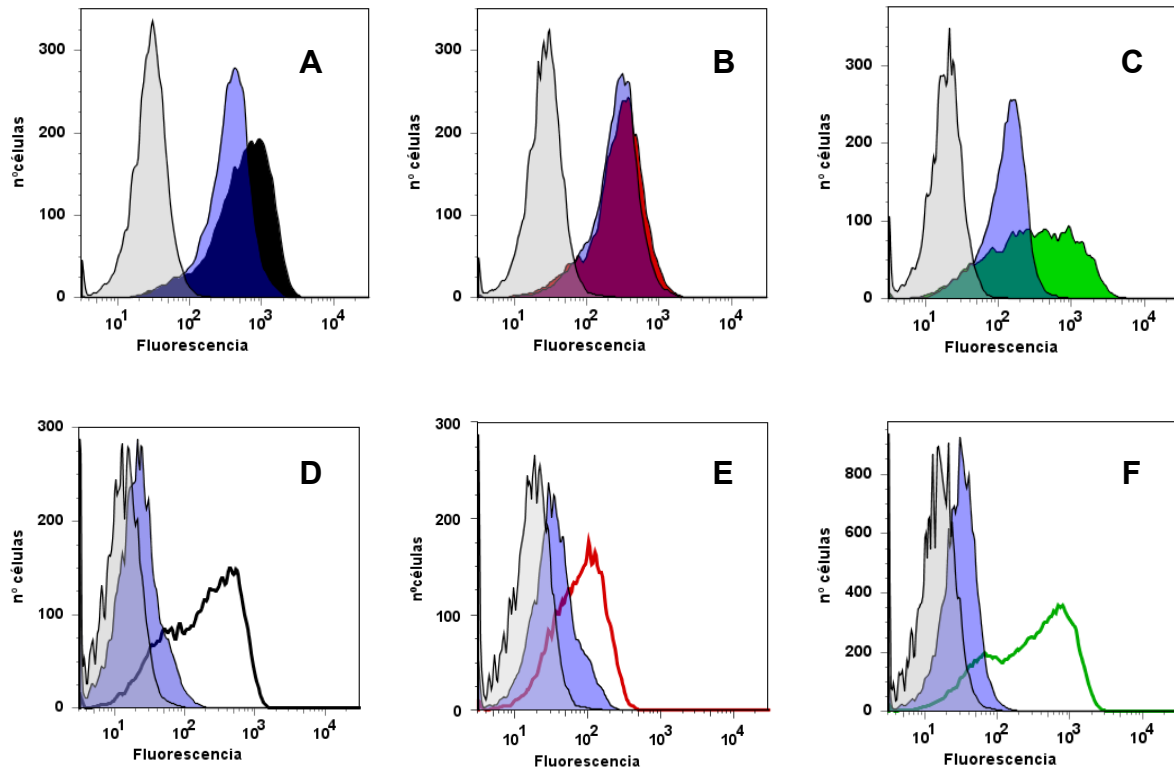


Figura 4.16. Ensayo por citometría de flujo de los anticuerpos anti-F_C, anti-F_{C/ΔTM-} y anti-F_{C/TM-} antes o después de la adsorción a células infectadas con el virus VAC/P. En cada panel se muestra el resultado de la citometría de flujo con células HEp-2 (histograma gris), con células HEp-2 infectadas a una moi de 1 ufp/célula con el virus VAC/P (histograma azul) y células HEp-2 infectadas a una moi de 1 ufp/célula con el virus VAC/F_C (histograma relleno para anticuerpos de partida y vacíos para los deplecionados de anticuerpos anti-VAC). Los anticuerpos utilizados en cada panel fueron: (A) 1 µg de anti-F_C, (B) 1 µg de anti-F_{C/ΔTM-}, (C) 500 ng de anti-F_{C/TM-}, (D) 1 µg de anti-F_{C/ΔVAC}, (E) 1 µg anti-F_{C/ΔTM-ΔVAC} y (F) 500 ng de anti-F_{C/TM-ΔVAC}.

Por tanto, estos resultados confirman que los anticuerpos anti-F_{C/ΔTM-} son capaces de reconocer a la proteína F expresada en la membrana de células infectadas con el virus VAC/F_C, tal como se observó también con células infectadas con el VRSH. Sin embargo, en ambos casos los valores de fluorescencia obtenidos con los anticuerpos anti-F_{C/ΔTM-} fueron menores que los obtenidos con los anticuerpos anti-F_{C/TM-}. Es decir, la conformación de la proteína F reconocida por los anticuerpos anti-F_{C/ΔTM-} es probablemente menos abundante en la superficie de células infectadas que la reconocida por los anticuerpos anti-F_{C/ΔTM-}.

Tras eliminar los anticuerpos anti-VAC y comprobar que los anticuerpos anti-F_C, anti-F_{C/ΔTM-} y anti-F_{C/TM-} restantes siguen reconociendo a células infectadas con el virus VAC/F_C, se ensayó su capacidad de neutralizar la infección por el VRSH. En la Figura 4.17 se observa que, en todos los casos, los anticuerpos responsables de la neutralización del virus no se eliminaron tras la adsorción de las correspondientes preparaciones a células infectadas con el virus VAC/P. Así, las curvas de neutralización por los distintos anticuerpos fueron muy similares antes o después de la eliminación de los anticuerpos anti-VAC.

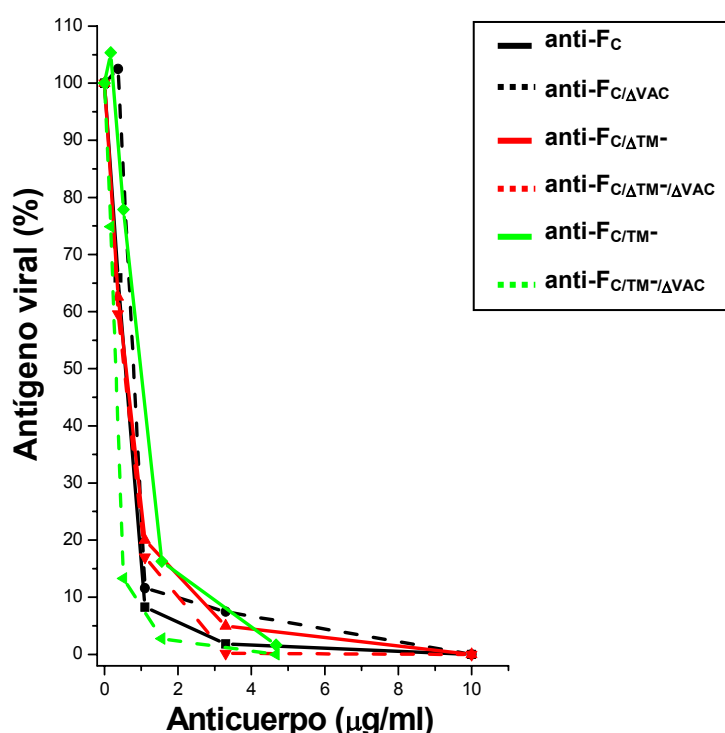


Figura 4.17. Ensayo de neutralización del VRSH por los anticuerpos anti-F_C, anti-F_{C/ΔTM-} y anti-F_{C/TM-} antes o después de la adsorción a células infectadas con el virus VAC/P. $6,5 \times 10^3$ ufp de la cepa Long del VRSH se preincubaron durante 30 minutos a 37°C con distintas cantidades de los anticuerpos indicados. Con la mezcla de virus y anticuerpo se infectaron células HEp-2 y a las 72 horas se cuantificó la infectividad viral midiendo la cantidad de antígeno viral producido, representada como el porcentaje del valor obtenido en ausencia de anticuerpo (apartado 3.2.4.3A). Los anticuerpos deplecionados de anticuerpos anti-VAC se representan en línea discontinua del mismo color que el material de partida.

4.3.6. Caracterización de los anticuerpos anti- F_C deplecionados de los anticuerpos que se unen a células infectadas con el virus VAC/ F_C

Para comprobar que los anticuerpos neutralizantes presentes en el suero anti- F_C son realmente aquellos que reconocen a la proteína F, las distintas preparaciones de esos anticuerpos descritas en apartados anteriores se adsorbieron a células infectadas con un virus vaccinia que expresa la proteína F del VRSH (VAC/ F_C). La adsorción se realizó de igual manera que la mencionada anteriormente con el virus VAC/P (apartado 4.3.5), obteniéndose así los anticuerpos anti- $F_{C/\Delta VAC-F}$, anti- $F_{C/\Delta TM^-/\Delta VAC-F}$ y anti- $F_{C/TM^-/\Delta VAC-F}$. Para comprobar que se habían eliminado los anticuerpos que reconocen a antígenos del virus vaccinia de esas preparaciones, se ensayó la reactividad de las mismas por ELISA, usando un extracto de células infectadas con el virus VAC/P. Como se observa en la Figura 4.18A, las tres preparaciones de anticuerpos mostraron una pérdida casi completa de reactividad tras la eliminación de los anticuerpos adsorbidos a células HEP-2 infectadas con virus VAC/ F_C . Esas mismas preparaciones de anticuerpos se ensayaron también por ELISA frente a proteína F_{TM^-} purificada. Como se observa en la Figura 4.18B, la adsorción a células infectadas con el virus VAC/ F_C eliminó los anticuerpos que reconocen a la proteína F_{TM^-} de las preparaciones anti- F_C y anti- F_{C/TM^-} .

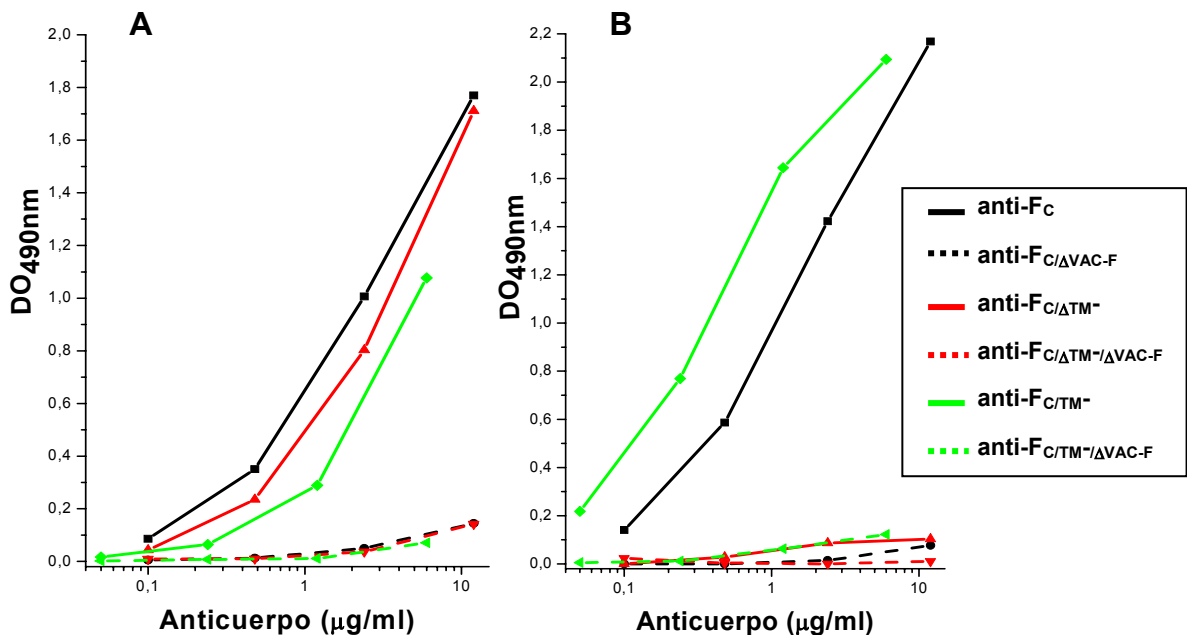


Figura 4.18. Titulación por ELISA directo de los anticuerpos anti- F_C , anti- $F_{C/\Delta TM^-}$ y anti- F_{C/TM^-} antes o después de la adsorción a células infectadas con el virus VAC- F_C . En el panel A se muestra la unión de los anticuerpos indicados a un extracto de células HEP-2 infectadas con el virus VAC/P. En la gráfica B se muestra la unión de los mismos anticuerpos a la proteína F_{TM^-} purificada. Los anticuerpos de partida (línea continua) y los correspondientes tras la adsorción a células HEP-2 infectadas con el virus VAC/ F_C (línea discontinua) se muestran con el mismo color.

La eliminación de los anticuerpos anti-VAC y de los anticuerpos que reconocen a la proteína F, se comprobó también por citometría de flujo de células infectadas con virus vaccinia recombinantes. En la Figura 4.19 se muestran tres paneles correspondientes a los anticuerpos deplecionados de anticuerpos anti-VAC/F_C: anti-F_{C/ΔVAC-F} (panel A), anti-F_{C/ΔTM-/ΔVAC-F} (panel B), y anti-F_{C/TM-/ΔVAC-F} (panel C). En todos los casos, se observa que no hubo unión de los anticuerpos a células infectadas con el virus VAC/F_C (A negro, B rojo, C verde, histogramas vacíos) o con el VAC/P (azul), puesto que los correspondientes histogramas solapaban prácticamente con los de las células sin infectar (gris). En cada panel se representa también la unión a células infectadas con el virus VAC/F_C del material de partida antes de la adsorción (A negro, B rojo, C verde, histogramas rellenos).

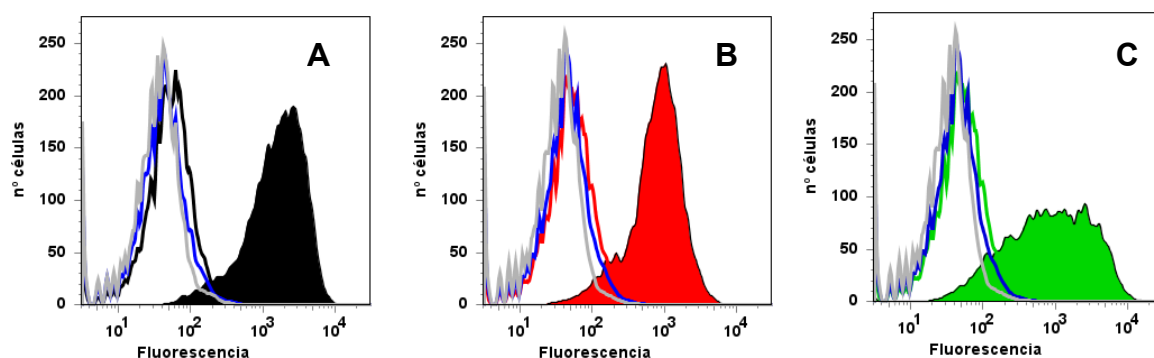


Figura 4.19. Citometría de flujo de los anticuerpos anti-F_C, anti-F_{C/ΔTM-} y anti-F_{C/TM-} antes o después de la adsorción a células infectadas con el virus VAC/F_C. En cada panel se muestra el resultado de la unión de los anticuerpos anti-F_{C/ΔVAC-F} (1 μg, A), anti-F_{C/ΔTM-/ΔVAC-F} (1 μg, B) y anti-F_{C/TM-/ΔVAC-F} (500 ng, C) a células HEP-2 sin infectar (histograma gris), a células HEP-2 infectadas con el virus VAC/P (histograma azul) o a células HEP-2 infectadas con el virus VAC/F_C (histogramas vacíos de distintos colores para cada anticuerpo) y de sus correspondientes anticuerpos de partida a células infectadas con el virus VAC/F_C (histogramas rellenos): anti-F_C (1 μg, A), anti-F_{C/ΔTM-} (1 μg, B) y anti-F_{C/TM-} (500 ng, C).

La eliminación de los anticuerpos que reconocen a la proteína F se comprobó también por citometría de células infectadas con el VRSH. En la Figura 4.20 se observa que la fluorescencia media de la unión de los distintos anticuerpos a células infectadas con el VRSH disminuyó a valores prácticamente negativos en las preparaciones de anti-F_C, anti-F_{C/ΔTM-} y anti-F_{C/TM-} después de la citada adsorción.

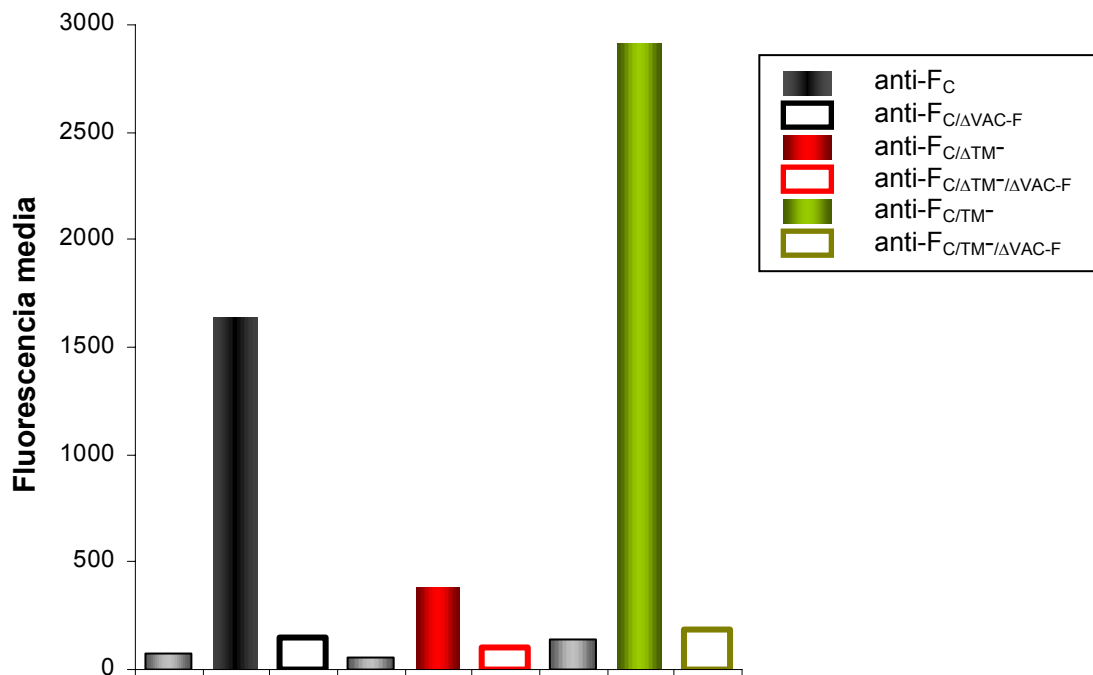


Figura 4.20. Citometría de flujo de los anticuerpos anti-F_C, anti-F_{C/ΔTM-} y anti-F_{C/ΔTM-/ΔVAC-F} antes o después de la adsorción a células infectadas con VAC/F_C. Células HEp-2 se infectaron a una moi de 1 ufp/célula con la cepa Long. A las 24 horas post-infección, tras despegar las células, se incubaron con los anticuerpos anti-F_C (1 μg), anti-F_{C/ΔTM-} (1 μg) y anti-F_{C/ΔTM-/ΔVAC-F} (500ng) de partida (barras rellenas) o los obtenidos después de la adsorción a células HEp-2 infectadas con VAC/F_C (barras vacías). Se representa la fluorescencia media de las células en cada caso. Las barras de color gris corresponden a la citometría de células sin infectar (mock), que sólo se muestra con el anticuerpo de partida ya que presentaba valores similares al obtenido tras la adsorción.

Seguidamente se comprobó si la adsorción de los distintos anticuerpos a células infectadas con virus VAC/F_C eliminó la capacidad neutralizante de los mismos. Para ello, la cepa Long del VRSH se incubó con las preparaciones de anticuerpos, antes o después de la adsorción, y las mezclas correspondientes se emplearon para infectar células HEp-2. Como se observa en la Figura 4.21, la infectividad del VRSH disminuyó sensiblemente cuando el virus se incubó con las preparaciones de anti-F_C, anti-F_{C/ΔTM-} o anti-F_{C/ΔTM-/ΔVAC-F} (líneas continuas); sin embargo, esas mismas preparaciones no tuvieron un efecto significativo sobre la infectividad viral después de haber eliminado los anticuerpos que se unieron a células HEp-2 infectadas con el virus VAC/F_C. Por lo tanto, estos resultados indican que los anticuerpos neutralizantes presentes en un suero de conejo inmunizado con el virus VAC/F_C están dirigidos frente a la proteína F del VRSH.

Por otra parte, y como se había visto en apartados anteriores, los anticuerpos anti- $F_{C/\Delta TM^-}$, que no reconocen a la proteína F_{TM^-} , neutralizaron al virus más eficientemente que los anticuerpos anti- F_{C/TM^-} , ya que éstos son anticuerpos purificados específicos de la proteína F.

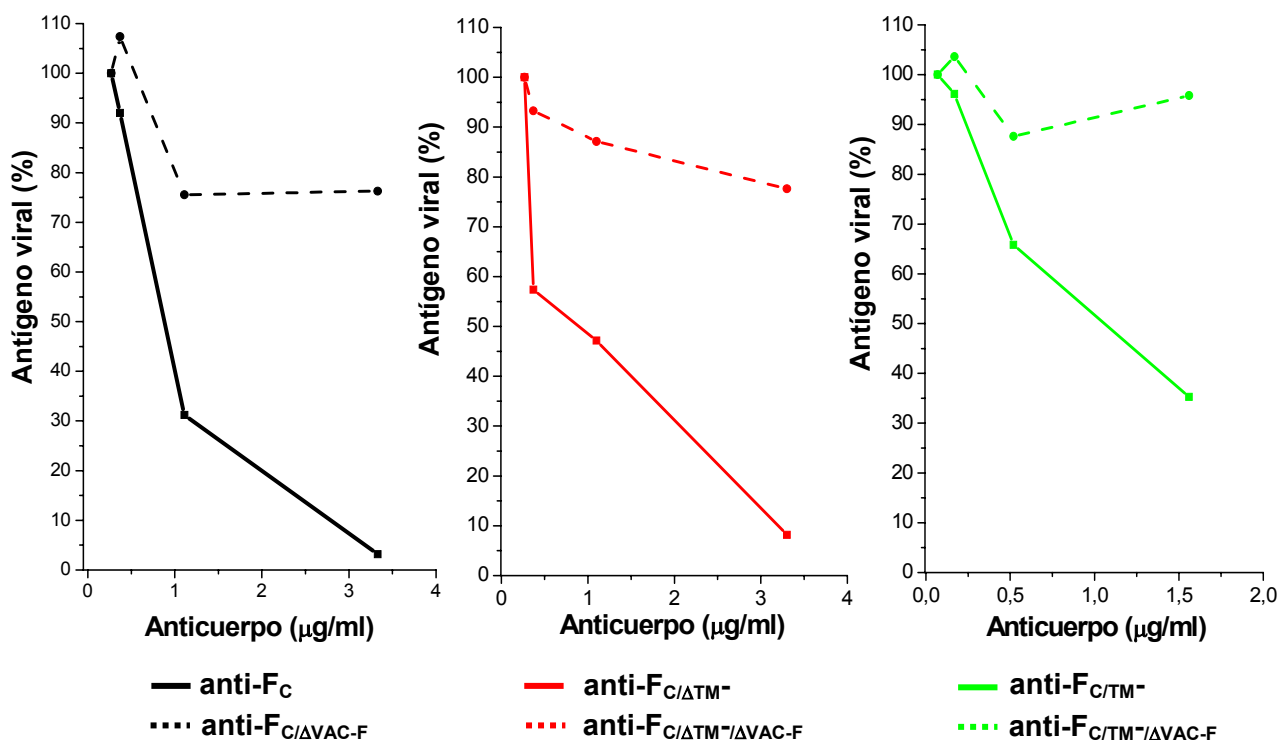


Figura 4.21. Capacidad neutralizante de los anticuerpos anti- F_C , anti- $F_{C/\Delta TM^-}$ y anti- F_{C/TM^-} antes o después de la adsorción a células infectadas con el virus VAC/ F_C . Células HEp-2 se infectaron con $6,5 \times 10^3$ ufp de la cepa Long del VRSH preincubado 30 minutos a 37°C con distintas cantidades de cada preparación de anticuerpo de partida (línea continua) o los obtenidos tras la adsorción a células HEp-2 infectadas con el virus VAC/ F_C (línea discontinua), indicado debajo de cada panel. A las 72 horas se cuantificó la infectividad viral midiendo la cantidad de antígeno viral producido que se representa como el porcentaje del valor obtenido en ausencia de anticuerpo.

4.3.7. Inhibición de la formación de sincitios por los anticuerpos anti-F_C

Como se ha mencionado anteriormente, la proteína F también promueve la fusión de la membrana de la célula infectada con la de células adyacentes, dando lugar a la formación de sincitios (células multinucleadas). Para evaluar si los anticuerpos anti-F_C eran capaces de inhibir la formación de sincitios, y si esta capacidad se perdía al eliminar los anticuerpos anti-VAC/F_C, células HEp-2 se infectaron con el VRSH, y tras permitir la entrada del virus a las células, se añadieron los anticuerpos al medio y a las 48 horas post-infección se tiñeron las células por inmunofluorescencia indirecta.

Como se observa en la Figura 4.22, las distintas fracciones de anticuerpos anti-F_C inhibieron la formación de sincitios, característica de la infección por el VRSH, observándose sólo células individuales fluorescentes (paneles de la izquierda). Lo mismo ocurrió cuando de estas fracciones se eliminaron los anticuerpos anti-VAC (paneles centrales). Sin embargo, la adsorción de los anticuerpos a células infectadas con el virus VAC/F_C eliminó esa capacidad inhibidora de las preparaciones de anticuerpos, por lo que el virus fue capaz de inducir la formación de sincitios en células HEp-2 infectadas con la cepa Long del VRSH. Este mismo resultado se obtuvo al realizar el ensayo de formación de sincitios en células tranfectadas con un plásmido que lleva clonado el gen que codifica para la proteína F del VRSH (pTM1-F) (no mostrado).

Por lo tanto, cuando se eliminan los anticuerpos anti-VAC/F_C de las preparaciones de anticuerpos indicadas anteriormente, no sólo se pierde su capacidad de unirse a células infectadas que expresan la proteína F en su membrana (Figuras 4.19 y 4.20), sino también su capacidad neutralizante (Figura 4.21) y su capacidad de inhibir la formación de sincitios (Figura 4.22).

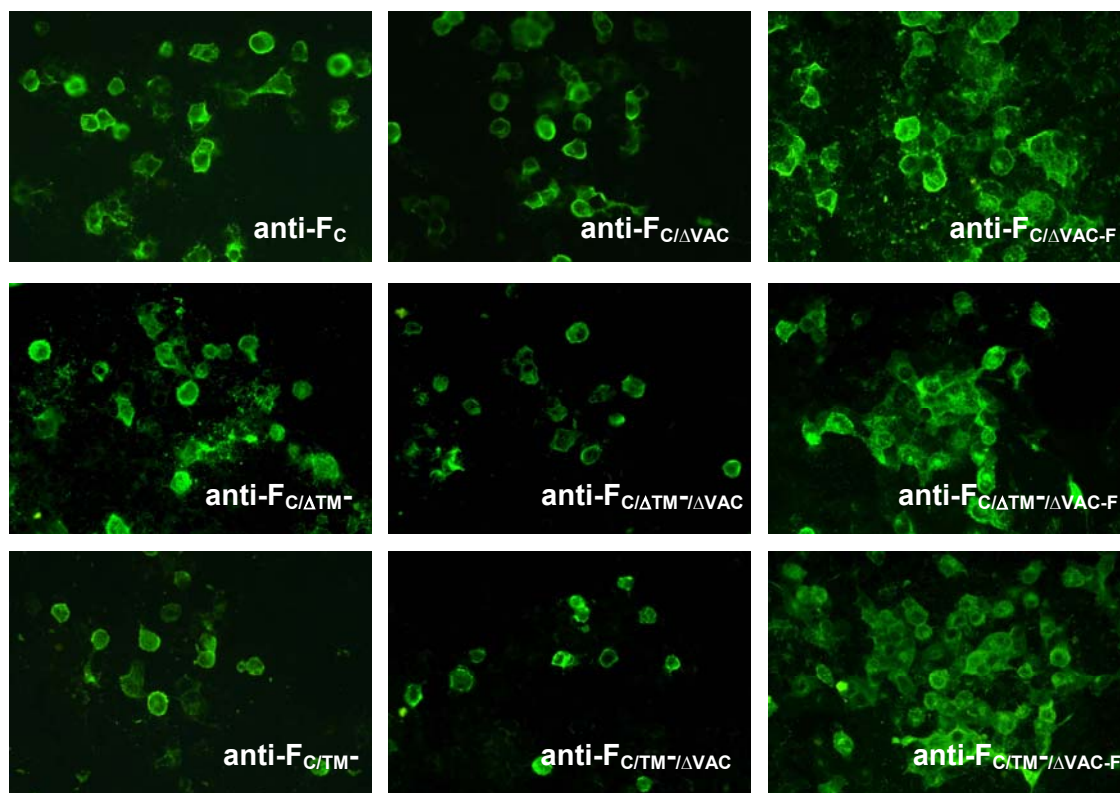


Figura 4.22. Ensayo de inhibición de formación de sincitios por anticuerpos anti- F_C . Células HEp-2 se infectaron con la cepa Long del VRSH a una moi de 1ufp/célula. Tras 90 minutos de adsorción del virus a 37°C, se quitó el inóculo y se lavaron las células con medio de cultivo; 5 horas después se añadieron los anticuerpos anti- F_C (40μg/ml), anti- $F_{C/\Delta TM^-}$ (40μg/ml) o anti- F_{C/TM^-} (10μg/ml) antes (paneles de la izquierda) o después de la adsorción a células HEp-2 infectadas con el virus VAC/P (paneles centrales) o a células HEp-2 infectadas con el virus VAC/ F_C . La formación o no de sincitios se observó a las 48 horas por inmunofluorescencia como se describe en el apartado 3.2.4.4 de Métodos.

Como resumen de los resultados mostrados en los apartados anteriores, la inmunización de conejos con un virus vaccinia que expresa la proteína F del VRSH anclada a la membrana (VAC/ F_C), induce anticuerpos neutralizantes que reconocen conformaciones distintas de la proteína F. Una de estas conformaciones es la que adopta el ectodominio de la proteína F cuando se expresa como forma soluble (F_{TM^-}) de la proteína y que, presumiblemente, corresponde a la estructura post-fusión de esa molécula. Otra forma (o formas) de la proteína F sería la que reconocen los anticuerpos anti- $F_{C/\Delta TM^-}$ y que podría corresponder a la estructura pre-fusión de esa molécula, ya que estos anticuerpos inhiben la infectividad viral cuando se incuban con el virus antes de que éste entre en contacto con la célula diana.

4.4. COMPARACIÓN DE LAS DISTINTAS FORMAS DE LA PROTEÍNA F RECONOCIDAS POR LOS ANTICUERPOS ANTI-F_{C/ΔTM}- Y ANTI-F_{C/TM}-

Para profundizar en el estudio de las distintas conformaciones de la proteína F reconocidas por anticuerpos presentes en un suero de conejo anti-VAC/F_C, se analizó si estas conformaciones estaban presentes, además de en la superficie del virus y de células infectadas, en extractos de células infectadas con el VRSH. Para ello, las preparaciones de anticuerpos se ensayaron en un ELISA utilizando como antígeno un extracto de células HEp-2 infectadas con la cepa Long del virus. Además, y como control del ensayo, se evaluó en paralelo la unión de los distintos anticuerpos a proteína F_{TM}- purificada.

En la Figura 4.23, se observa que los anticuerpos anti-F_C y anti-F_{C/TM}- reconocieron igualmente al extracto de células infectadas (línea continua) y a la proteína F_{TM}- purificada (línea discontinua). Sin embargo, los anticuerpos anti-F_{C/ΔTM}- no reconocieron a la proteína F_{TM}- (línea roja discontinua) pero presentaron una reactividad positiva con el extracto de células infectadas con el VRSH (línea roja continua). Es decir, en esos extractos deben existir otras formas de la proteína F distintas a la que adopta la proteína F_{TM}-.

La conformación de la proteína F reconocida por los anticuerpos anti-F_{C/ΔTM}- (Figura 4.23, línea roja continua) representa aparentemente una fracción minoritaria de la proteína F presente en los extractos de células infectadas por el VRSH, ya que a concentraciones saturantes de anticuerpo, los anti-F_{C/ΔTM}- presentan menor reactividad que los anticuerpos anti-F_{C/TM}- (línea verde continua).

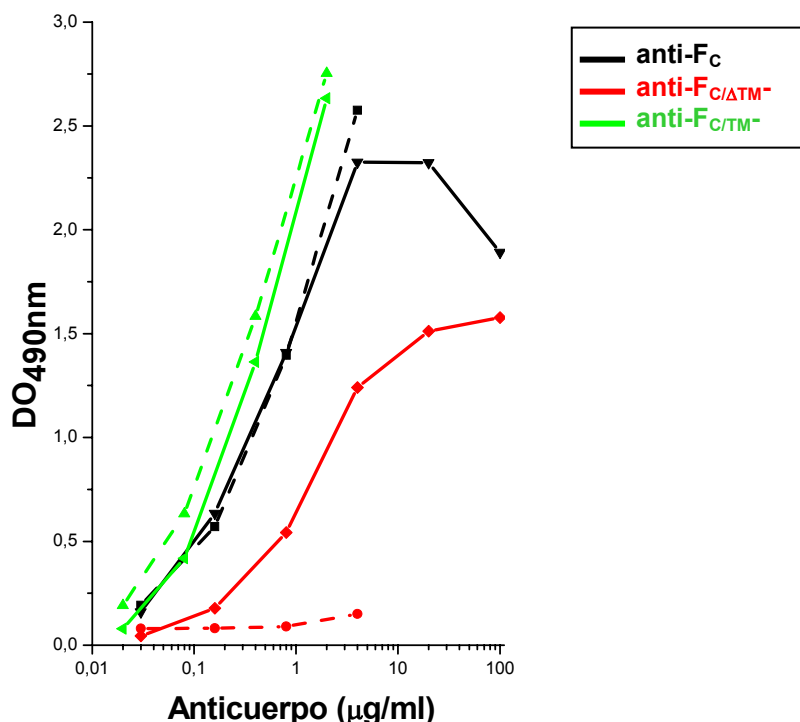


Figura 4.23. Unión de los anticuerpos anti-F_C, anti-F_{C/ΔTM-} y anti-F_{C/TM-} en ELISA a un extracto de células infectadas con el VRSH y a la proteína F_{TM-} purificada. Se muestra la unión de los anticuerpos a un extracto de células infectadas con el VRSH (línea continua) y a la proteína F_{TM-} purificada (línea discontinua) en un ELISA directo (apartado 3.2.4.1A).

4.4.1. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de las formas de proteína F reconocidas por los distintos anticuerpos anti-F_C

Como se mencionó en la Introducción, la estructura de la proteína F experimenta cambios drásticos durante el proceso de fusión de membranas (Russell y col., 2006), pasando de una estructura metaestable pre-fusión a otra mucho más estable post-fusión (Yin y col., 2005, 2006). En el caso de la proteína F del virus de la parainfluenza tipo 5 (VPI5) se ha demostrado que esa transición se produce si la proteína F pre-fusión se calienta a 55°C (Connolly y col., 2006).

Para comprobar si la conformación de la proteína F reconocida por los anticuerpos anti-F_{C/ΔTM-} tiene un comportamiento similar a la conformación pre-fusión de otros paramixovirus en cuanto a su estabilidad térmica, el extracto de células infectadas con el VRSH se incubó a distintas temperaturas antes de evaluar su reactividad con los anticuerpos anti-F_C, anti-F_{C/ΔTM-} y anti-F_{C/TM-}.

En la Figura 4.24, se observa como la reactividad de los anticuerpos anti- $F_{C/TM-}$ no se perdió hasta que el extracto de células infectadas por el VRSH se calentó a temperaturas próximas a los 100°C ($T_m \sim 90^\circ\text{C}$). Este comportamiento es análogo al descrito para la proteína F_{TM-} purificada (Ruiz-Argüello y col., 2004). El mismo resultado se obtuvo con los anticuerpos anti- F_C . Sin embargo, la reactividad con los anticuerpos anti- $F_{C/\Delta TM-}$ se perdió al calentar el extracto de células infectadas a temperaturas considerablemente inferiores ($T_m \sim 65^\circ\text{C}$). Estos resultados refuerzan la idea de que en un extracto de células infectadas con el VRSH, la proteína F puede adoptar formas diferentes con distinta termoestabilidad.

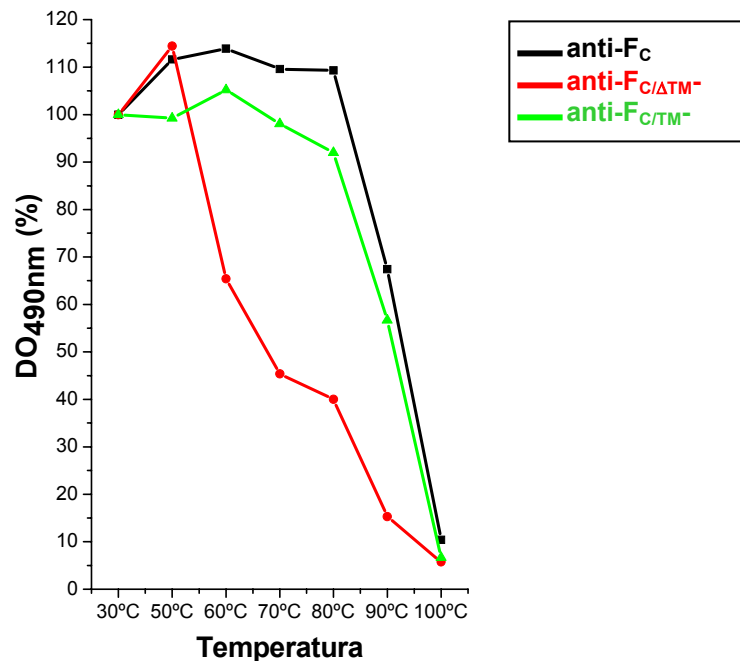


Figura 4.24. Unión de los anticuerpos anti- F_C , anti- $F_{C/\Delta TM-}$ y anti- $F_{C/TM-}$ a un extracto de células HEp-2 infectadas con el VRSH incubado a distintas temperaturas durante 30 minutos. La reactividad se representa como el porcentaje de absorbancia obtenido por ELISA directo respecto al control que se mantuvo a 30°C.

4.4.2. Efecto de distintos agentes y pHs sobre la estabilidad de las formas de proteína F reconocidas por los distintos anticuerpos anti- F_C

De manera análoga a los ensayos de termoestabilidad descritos en el apartado anterior, se evaluó la sensibilidad de las formas de la proteína F

reconocidas por los anticuerpos anti-F_{C/ΔTM}- y anti-F_{C/TM}- a agentes caotrópicos como la urea, que rompe los puentes de hidrógeno que estabilizan las estructuras de α -hélice, o a agentes reductores como el ditiotreitól (DTT), que rompe los puentes disulfuro. Así, extractos de células HEp-2 infectadas con el VRSH se trataron con urea 6M, o con DTT 2mM o con ambos agentes simultáneamente antes de evaluar su reactividad con los anticuerpos. Como se muestra en la Figura 4.25A, cualquiera de esos tratamientos no afectó sustancialmente la reactividad de los anticuerpos anti-F_{C/ΔTM}- o anti-F_{C/TM}- con la proteína F del extracto.

Así mismo se evaluó el efecto de distintos pHs sobre la estabilidad de las formas de proteína F reconocidas por los anticuerpos anti-F_{C/ΔTM}- y anti-F_{C/TM}-. La Figura 4.25B muestra que sólo la preincubación del extracto de células infectadas por el VRSH a pH muy ácido (pH 2,5) redujo algo la reactividad con los anticuerpos anti-F_{C/ΔTM}-, mientras que la reactividad tanto de esos anticuerpos como la de los anticuerpos anti-F_{C/TM}- no se vió alterada por pretratamientos con un amplio rango de pHs.

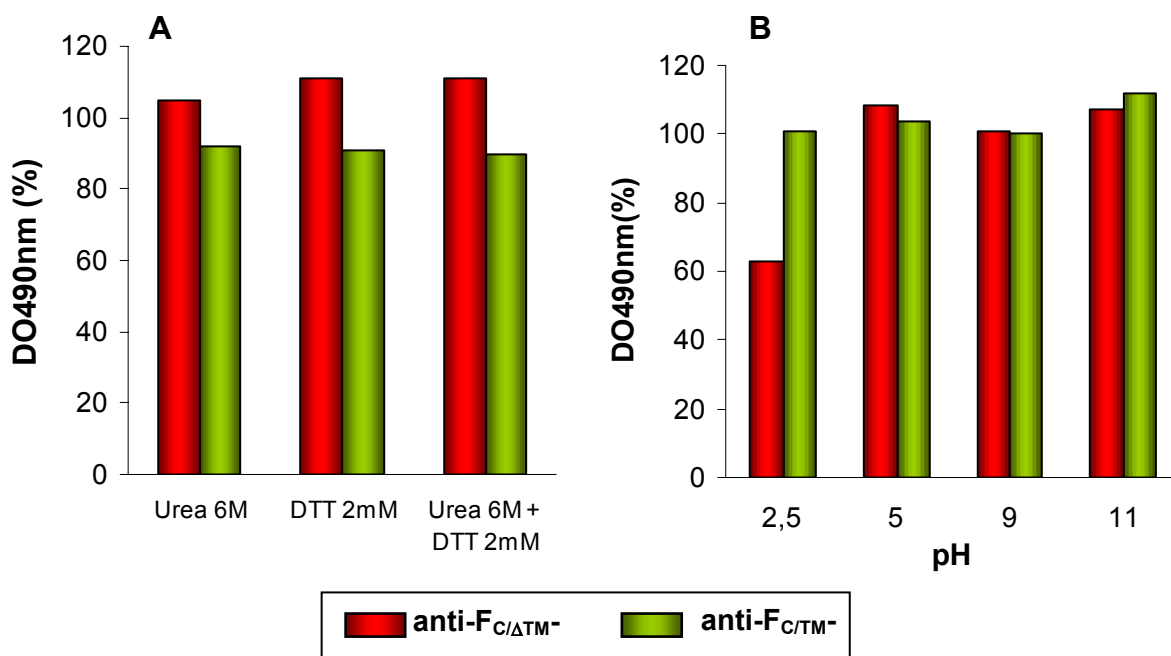


Figura 4.25. Unión de los anticuerpos anti-F_{C/ΔTM}- y anti-F_{C/TM}- a un extracto de células infectadas con el VRSH sometido a condiciones desnaturalizantes (A) o a distintos pHs (B) durante 30 minutos. Se representa en el eje de ordenadas el porcentaje de absorbancia obtenido por ELISA directo respecto al control (extracto en PBS a pH 7,4), y en el eje de abscisas las distintas condiciones desnaturalizantes (urea y/o DTT) (A) o los distintos valores de pHs (B).

4.5. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS OBTENIDOS POR INMUNIZACIÓN DE CONEJOS CON UN VIRUS VACCINIA QUE EXPRESA UNA PROTEÍNA F SOLUBLE (VAC/F_{TM-})

En los apartados anteriores se ha descrito la obtención de anticuerpos neutralizantes que reconocen conformaciones distintas de la proteína F al inmunizar conejos con un virus vaccinia que expresa la proteína F completa (VAC/F_C). Para comprobar si la inducción de estos anticuerpos requiere que la proteína F se presente anclada en la membrana, se inmunizaron conejos con un virus vaccinia que expresa una forma soluble de la proteína F (F_{TM-}). La inmunización con el virus VAC/F_{TM-} se realizó siguiendo el mismo protocolo que con el virus VAC/F_C (apartado 3.2.1). Para comparar los anticuerpos inducidos con los presentes en el suero anti-VAC/F_C, ambos sueros se titularon por ELISA utilizando como antígeno proteína F_{TM-}, y se cuantificó su capacidad neutralizante.

Como se observa en la Figura 4.26A, en el suero anti-VAC/F_{TM-} (línea azul) existe la misma cantidad de anticuerpos que reconocen en un ELISA a la proteína F_{TM-} que en el suero anti-VAC/F_C (línea negra). Sin embargo, los anticuerpos del suero anti-VAC/F_{TM-} fueron menos neutralizantes que los inducidos por la proteína F completa, ya que a la misma cantidad de suero incubada con el virus, la cantidad de antígeno viral producido es mayor en el caso del suero anti-VAC/F_{TM-} (Figura 4.26B). Este resultado indica que la forma de presentar la proteína F en la inmunización influye en el tipo de anticuerpos que se inducen.

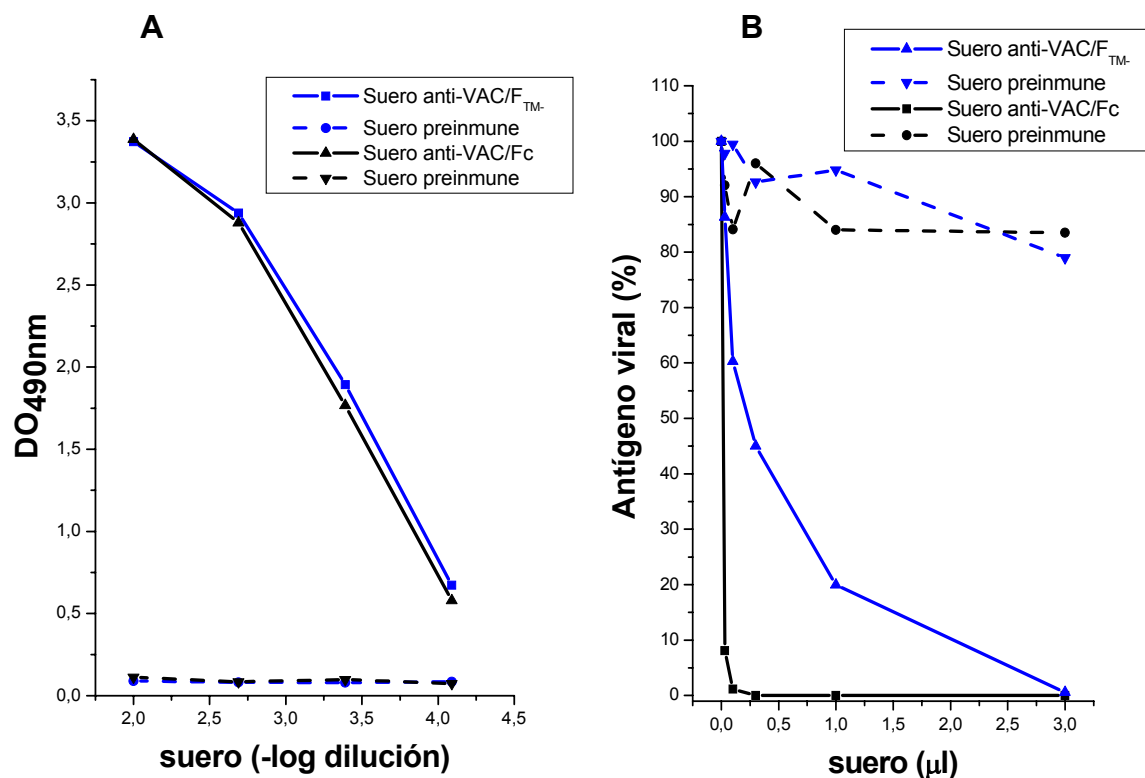


Figura 4.26. Titulación por ELISA (A) y capacidad neutralizante (B) de los sueros anti-VAC/F_{TM}- y anti-VAC/F_C. **A:** Diluciones seriadas del suero anti-VAC/F_{TM}- o anti-VAC/F_C se ensayaron en un ELISA directo frente a la proteína F_{TM}- purificada. **B:** Células HEP-2 se infectaron con $6,5 \times 10^3$ ufp de la cepa Long del VRSH preincubado durante 30 minutos a 37°C con diluciones del suero anti-VAC/F_{TM}- o anti-VAC/F_C. Con la mezcla de virus y suero se infectaron las células y la infectividad viral se cuantificó midiendo la cantidad de antígeno viral producido que se representa como el porcentaje del valor obtenido en ausencia de anticuerpo. Como control negativo de la titulación y neutralización se añadieron los sueros preinmunes de los conejos.

4.5.1. Depleción de los anticuerpos anti-F_{TM}- del suero anti-VAC/F_{TM}-

Los anticuerpos del suero anti-VAC/F_{TM}- se purificaron por medio de una columna de proteína A-Sepharosa y de estos anticuerpos purificados anti-F_{TM}- se eliminaron los anticuerpos anti-F_{TM}- mediante cromatografía en columnas de Sepharosa-F_{TM}- del mismo modo que se hizo con los anticuerpos anti-F_C (apartado 4.3.2). Para comprobar la eliminación de estos anticuerpos, se ensayaron el material de partida (anti-F_{TM}-) y el material no retenido en la columna (NR) en un ELISA directo utilizando la proteína F_{TM}- como antígeno. En la Figura 4.27 se observa como el material no retenido en la columna (línea naranja) había perdido la mayor parte de la reactividad con la proteína F_{TM}-. La fracción no retenida (NR) de la columna se denominó anti-F_{TM}-/NR, y la fracción eluída anti-F_{TM}-/E.

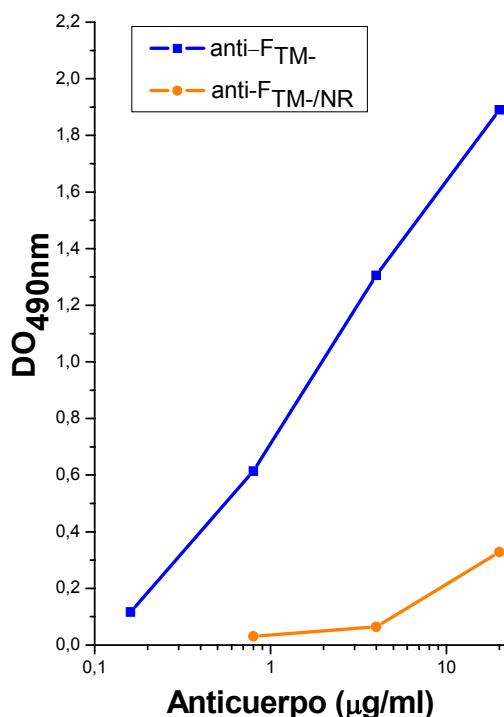


Figura 4.27. Titulación en ELISA de anticuerpos anti-F_{TM}-. Diluciones seriadas de los anticuerpos anti-F_{TM}- (material de partida) y anti-F_{TM}-NR (no retenido) se ensayaron frente a la proteína F_{TM}- purificada en un ELISA directo, tal y como se describe en el apartado 3.2.4.1A de Métodos.

4.5.2. Unión a células infectadas con el VRSH de los anticuerpos anti-F_{TM}-NR

Una vez comprobado que al pasar los anticuerpos anti-F_{TM}- por la columna de Sepharosa-F_{TM}-, el material no retenido de la columna carece de anticuerpos que reconozcan a la proteína F_{TM}- en un ELISA, se comprobó si las distintas fracciones de anticuerpos obtenidas tras la cromatografía, reconocían a la proteína F expresada en la membrana de células infectadas con el VRSH. Para ello, células HEp-2 se infectaron con la cepa Long del VRSH. A las 24 horas post-infección, se incubaron con los anticuerpos anti-F correspondientes. La unión de estos anticuerpos a la superficie celular se cuantificó por citometría de flujo.

En la Figura 4.28A se observa que al eliminar los anticuerpos anti-F_{TM}- presentes en un suero anti-VAC/F_{TM}-, no se detectaron anticuerpos que se uniesen a la membrana de células infectadas con el VRSH (barra naranja), dando valores de fluorescencia similares a los obtenidos con células sin infectar (barras grises). Este

resultado contrasta con el obtenido con anticuerpos anti- F_C (Figura 4.28B) donde, como se mostró previamente, hay anticuerpos que no reconocen a la proteína F_{TM^-} (anti- $F_{C/\Delta TM^-}$) pero sin embargo reconocen a la proteína F expresada en la superficie de células infectadas por el VRSH (barra roja)

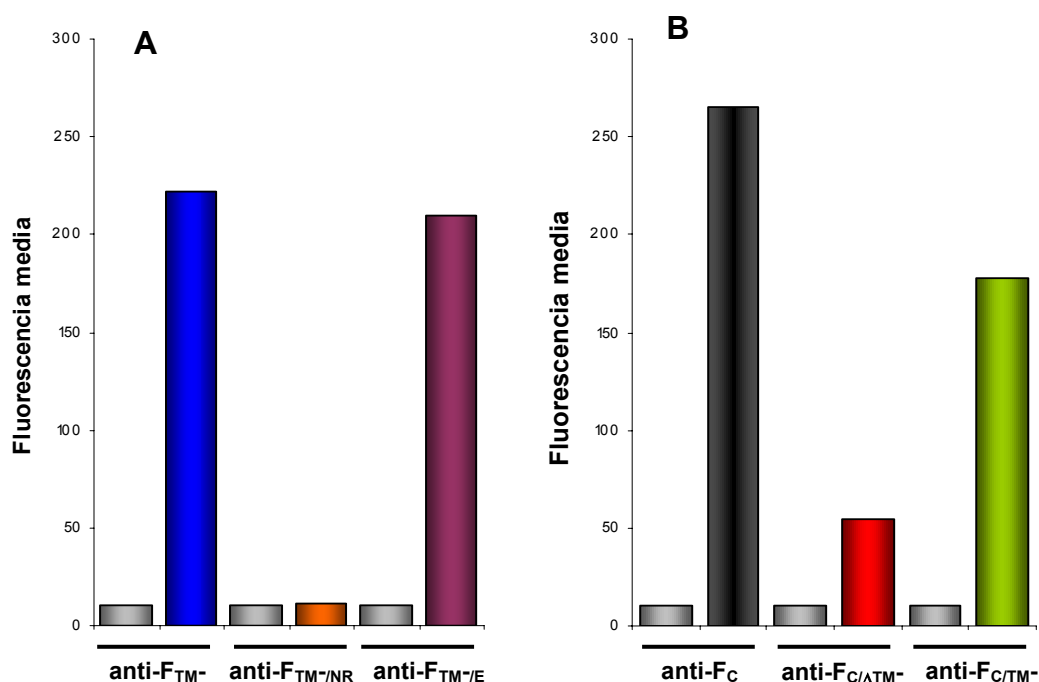


Figura 4.28. Ensayo de citometría de flujo de anticuerpos presentes en un suero anti-VAC/ F_{TM^-} (A) o anti-VAC/ F_C (B) con células infectadas con el VRSH. Células HEp-2 se infectaron con la cepa Long a una moi de 1 ufp/célula. A las 24 horas post-infección las células se despegaron de la placa de cultivo y se incubaron con los anticuerpos anti-F indicados. La unión de anticuerpos a la superficie celular se cuantificó por citometría de flujo (apartado 3.2.4.2). Se representa la fluorescencia media de las células. Las barras de color gris corresponden a la citometría de células sin infectar.

4.5.3. Capacidad neutralizante de los anticuerpos anti- $F_{TM^-/NR}$

Una vez comprobado que los anticuerpos anti- $F_{TM^-/NR}$ del suero de conejo anti-VAC/ F_{TM^-} no reconocen a la proteína F_{TM^-} , ni a la proteína F expresada en la superficie de células infectadas con el VRSH, se comprobó si en esta preparación seguían existiendo anticuerpos neutralizantes.

Como se observa en la Figura 4.29A, los anticuerpos anti- F_{TM^-} y anti- $F_{TM^-/E}$ inhibieron la infectividad viral significativamente; por el contrario, los anticuerpos anti- $F_{TM^-/NR}$ (línea naranja) del suero anti-VAC/ F_{TM^-} , no neutralizaron al VRSH. Esto contrasta con los resultados mostrados en la Figura 4.29B, donde los anticuerpos

anti-F_{C/ΔTM-} de un suero anti-VAC/F_C (línea roja) neutralizaron la infectividad viral prácticamente igual que los anticuerpos totales (línea negra). Esto indica que los únicos anticuerpos neutralizantes que se inducen tras la inoculación de conejos con el virus VAC/F_{TM-} son los que reconocen a la forma soluble de la proteína F (F_{TM-}).

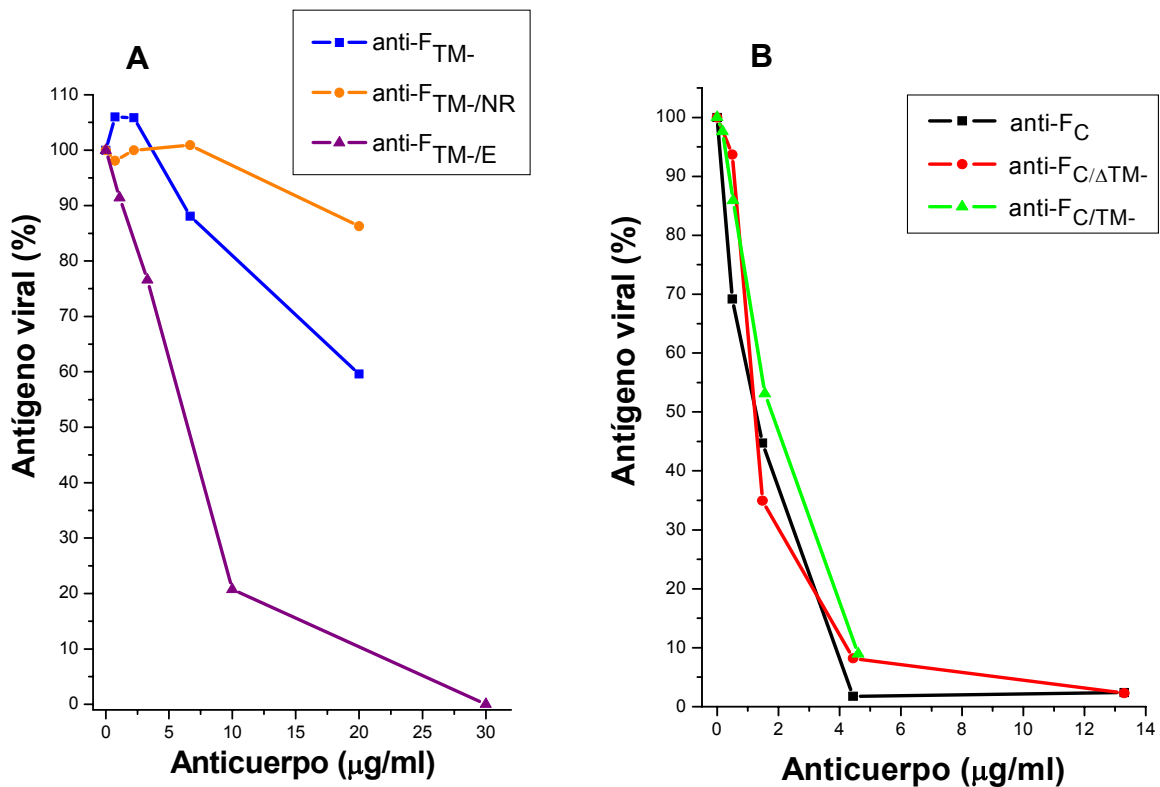


Figura 4.29. Ensayo de neutralización del VRSH por anticuerpos presentes en un suero anti-VAC/F_{TM-} (A) o anti-VAC/F_C (B). Células HEp-2 se infectaron con $6,5 \times 10^3$ ufp de la cepa Long del VRSH preincubado 30 minutos a 37°C con distintas cantidades de los anticuerpos indicados. La infectividad viral se cuantificó por la cantidad de antígeno viral producido a las 72 horas y se representa como el porcentaje del valor obtenido en ausencia de anticuerpo.

En resumen, los resultados mostrados en este apartado, junto con los de apartados anteriores, indican que la forma de presentación de la proteína F al sistema inmune de los conejos es determinante sobre el tipo de anticuerpos que se inducen tras la inmunización. Así, los anticuerpos altamente neutralizantes que además reconocen conformaciones distintas de la proteína F sólo se producen cuando los conejos se inoculan con un virus vaccinia que expresa la proteína F completa y, por tanto, es capaz de expresarse en la superficie de células infectadas.

5. DISCUSIÓN

5.1. NEUTRALIZACIÓN DEL VRSH POR DISTINTOS AGENTES INHIBIDORES DE LA FUSIÓN

Como se ha mencionado anteriormente, la fusión de membranas mediada por la proteína F es una etapa fundamental del ciclo infectivo del VRSH, y sobre la que se está investigando activamente en la búsqueda de agentes antivirales ya que transcurre en el exterior de la célula y por tanto es más accesible a inhibidores químicos o biológicos evitando así problemas de permeabilidad de membrana que tienen lugar en el caso de agentes que bloqueen etapas posteriores del ciclo infectivo. Las glicoproteínas F y G son las mayoritarias de la envuelta viral y las únicas capaces de inducir anticuerpos neutralizantes en animales de experimentación (Olmsted y col., 1986; Stott y col., 1987; Wertz y col., 1987; Connors y col., 1991) o tras la infección natural en humanos (Sastre y col., 2005), apoyando la idea de que las primeras etapas del ciclo infectivo pueden ser dianas adecuadas para el desarrollo de antivirales.

Los resultados presentados en esta Tesis muestran como la infectividad del VRSH puede ser neutralizada por distintos agentes que inhiben la fusión de membranas, tales como: AcMs anti-F, péptidos derivados de la RHB de la proteína F y compuestos de bajo peso molecular. La mayor o menor capacidad neutralizante de los AcMs anti-F depende de su especificidad por ciertos epítomos. También se ha demostrado que los AcMs anti-F 47F y 101F actúan por un mecanismo distinto que las otras pequeñas moléculas ensayadas, ya que son los únicos que inhiben la funcionalidad de la forma pre-fusión de la proteína F, mientras que el resto bloquean algún intermedio de fusión posterior a la activación de la proteína F.

Todos los AcMs anti-F ensayados tuvieron títulos similares de unión a la proteína F, medidos en ELISA (Figura 4.1A). Sin embargo, no existe una correlación entre la unión a la proteína F y la capacidad neutralizante y de inhibición de la formación de sincitios de estos AcMs ya que sólo dos de ellos, el AcM 47F (sitio antigénico II) y el AcM 101F (sitio antigénico IV) fueron capaces de inhibir totalmente la infectividad del virus (Figuras 4.1B y 4.4). Por lo tanto, la neutralización de la infectividad del VRSH por AcMs dirigidos contra la proteína F depende de la especificidad de los anticuerpos por ciertos epítomos de la proteína F. Incluso los

AcMs 56F, 101F y 102F que pertenecen al mismo sitio antigénico (IV) presentan capacidades neutralizantes distintas.

Cuando se localizan los sitios antigénicos (Figura 5.1) en dos modelos del ectodominio de la proteína F del VRSH, correspondientes a las posibles conformaciones pre-fusión y post-fusión de la misma, se observa que los cambios más drásticos de localización entre ambos modelos ocurren en el sitio antigénico I (Figura 5.1, bolas rojas), donde mapean los AcMs parcialmente neutralizantes 2F, 90F, 96F y 99F. Este sitio se encuentra en la parte baja de la cabeza de la proteína en el modelo pre-fusión, ocupando una zona poco accesible en comparación con la posición mucho más expuesta que ocupa en el modelo post-fusión. Sin embargo, los sitios antigénicos II y IV (Figura 5.1, bolas verdes y azules), donde mapean los AcMs altamente neutralizantes 47F y 101F, se encuentran muy accesibles en ambos modelos. Este hecho, podría explicar que anticuerpos con títulos similares en ELISA frente a la proteína F_{TM}- purificada, y constantes de afinidad parecidas (solamente calculadas para el AcM 2F y 101F) (Figura 4.6), tengan diferentes capacidades neutralizantes de la infectividad viral.

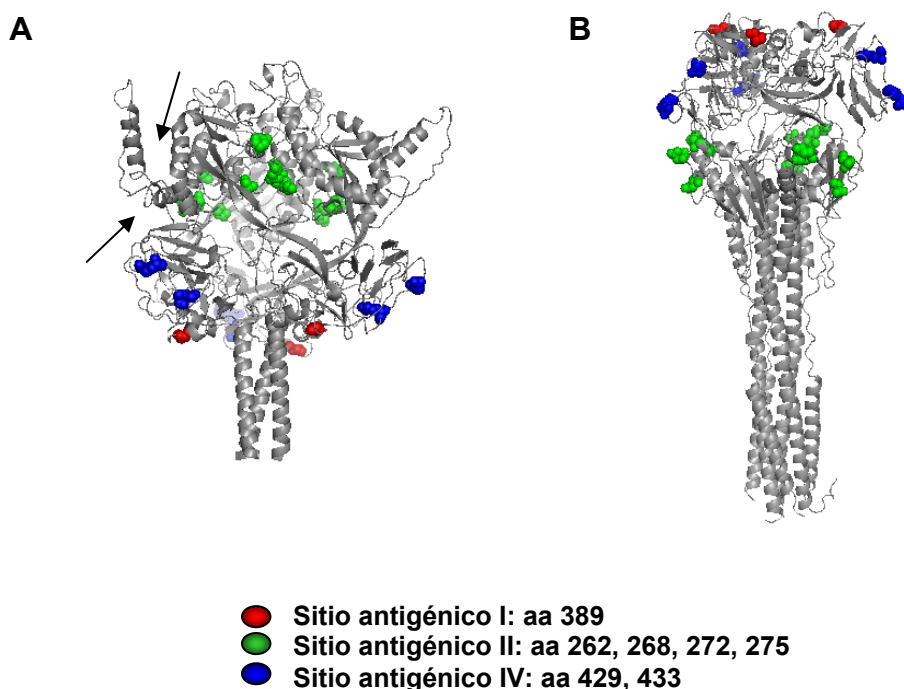


Figura 5.1. Modelos de la estructura tridimensional de la proteína F del VRSH. Estos modelos se construyeron basándose en las estructuras atómicas publicadas de las proteínas F del VPI5 (Yin y col., 2006) (forma pre-fusión, panel A) y del VPI3 (Yin y col., 2005) (forma post-fusión, panel B). Se muestran como bolas de colores los aminoácidos cuyo cambio en mutantes de escape produce pérdida de reactividad con AcMs que reconocen epítomos de los sitios antigénicos indicados en la Figura. En el modelo pre-fusión (A) se indican con flechas los dos sitios de procesamiento proteolítico (Paulino Gómez-Puertas, comunicación personal).

A pesar de que los AcMs anti-F presentan distintas capacidades neutralizantes, todos alteran al menos en parte, la funcionalidad de la proteína F, ya que a bajas concentraciones de anticuerpo todos producen la misma reducción de antígeno viral; sin embargo, a concentraciones mayores de anticuerpo, sólo dos de ellos fueron capaces de neutralizar totalmente la infectividad viral (Figura 4.1.B).

En este trabajo se ha demostrado que la valencia de los anticuerpos dirigidos contra la proteína F del VRSH puede influir en su eficiencia de neutralización. En el caso de la neutralización parcial que ejerce el AcM 2F, la bivalencia es fundamental, ya que su fragmento Fab no inhibe la infectividad viral (Figura 4.5), lo que sugiere, que este anticuerpo podría entrecruzar moléculas de proteína F en la partícula viral o agregar partículas virales reduciendo así la infectividad del virus. Sin embargo, la bivalencia no es imprescindible, aunque influye, en la neutralización por el AcM 101F, ya que su fragmento Fab inhibe la infectividad viral (Figura 4.5). Por lo tanto, el efecto inhibitor del AcM 101F debe ser un efecto directo de su unión a la proteína F. También se ha observado que las diferencias en la eficiencia en neutralización por este anticuerpo y su fragmento Fab no se deben sólo a diferencias en la afinidad por la proteína F, ya que el AcM 101F tiene una afinidad 5 veces mayor por la proteína F que su fragmento Fab, pero en cambio neutraliza aproximadamente 90 veces mejor que éste (Figura 4.6). Estos resultados coinciden con lo publicado por Wu y colaboradores (Wu y col., 2005) donde el fragmento Fab de un AcM dirigido contra la proteína F del VRSH, presenta una afinidad similar por la proteína F que su anticuerpo completo y que su fragmento (Fab)₂ pero sin embargo, neutraliza peor que éstos. Estos datos sugieren, que en la neutralización por anticuerpos altamente neutralizantes, la bivalencia no es determinante aunque puede influir por un mecanismo no relacionado con la afinidad.

También es posible que estas diferencias en neutralización entre anticuerpo y fragmento Fab puedan deberse a que neutralicen por mecanismos distintos. Se ha demostrado que el fragmento Fab de un anticuerpo humano que reconoce a la glicoproteína gp120 del VIH-1 neutraliza al virus por un mecanismo distinto que el anticuerpo completo (McInerney y col., 1997). Éste, inhibe la fusión de la membrana del virus con la de la célula diana, pero sin embargo, su fragmento Fab no inhibe la fusión aunque si la infectividad viral. Los autores del trabajo no han determinado el mecanismo de acción de este fragmento Fab pero postulan que posiblemente, una

vez que ha ocurrido la fusión de la membrana viral con la de la célula, y se libera la nucleoproteína al citoplasma celular, el fragmento Fab pueda neutralizar al virus de forma indirecta inhibiendo algún evento post-fusión o activándolo en el momento o lugar inadecuado.

La neutralización total que ejercen algunos anticuerpos dirigidos contra la proteína F, tales como los AcMs 47F y 101F, contrasta con el efecto neutralizante de los AcMs dirigidos contra la proteína de unión (G) del virus a la célula. Todos los AcMs anti-G obtenidos hasta el momento sólo son capaces de neutralizar débilmente la infectividad del virus (Anderson y col., 1988; García-Barreno y col., 1989; Walsh y col., 1989). Sin embargo, mezclas de AcMs anti-G dirigidos contra epítomos no solapantes de la proteína G (Martínez y Melero, 1998), o anticuerpos policlonales dirigidos contra esta proteína, neutralizan eficientemente al virus. Esto sugiere que la neutralización mediada por anticuerpos anti-G requiere la unión simultánea de varios anticuerpos a esta molécula lo que impediría estéricamente su unión a la superficie celular.

En cuanto al estudio de la neutralización del VRSH por otros agentes distintos a los anticuerpos, se han ensayado en esta Tesis varios compuestos de bajo peso molecular descritos en la literatura, y péptidos derivados de las regiones heptádicas de la proteína F del VRSH. Todos los compuestos derivados del benzimidazol ensayados neutralizaron al virus (Figura 4.7B). De forma análoga, los péptidos derivados de la RHB de la proteína F, al igual que ocurre con péptidos de otros virus con envuelta, tales como el VPIh3, el del sarampión y el VIH-1 (Lambert y col., 1996, Wild y col., 1992, 1994), también neutralizaron eficientemente la infectividad viral. Sin embargo, los péptidos derivados de la RHA no tuvieron ningún efecto sobre la infectividad del VRSH a las concentraciones ensayadas (Figura 4.7A). En el VIH-1 se ha descrito que los péptidos derivados de la RHA de la glicoproteína gp41 inhiben la infectividad viral a concentraciones 1000 veces mayores que los péptidos derivados de la RHB (Wild y col., 1992, 1994; Eckert y Kim, 2001). En nuestro caso, tanto péptidos de la RHA como otros péptidos irrelevantes de longitud similar mostraron una inhibición inespecífica a concentraciones superiores a 100 µg/ml.

Se ha propuesto que durante el proceso de fusión de membranas, la proteína F del VRSH, al igual que en otros virus con envuelta, experimenta cambios conformacionales mediante los cuales pasa de un estado pre-fusión a otro post-fusión a través de conformaciones intermedias más inestables (Lamb, 1993; Hernández y col., 1996; Chan y Kim, 1998; Weissenhorn y col., 1999). El bloqueo de dichos cambios conformacionales, impediría que la fusión de membranas llegue a completarse produciendo la inhibición de la infectividad viral. Una vez comprobado que distintos agentes (AcMs anti-F, péptidos derivados de la RHB y compuestos de bajo peso molecular) neutralizaban la infectividad del VRSH, se diseñó un experimento para determinar si esos agentes actuaban sobre la proteína F presente en la partícula viral aislada, o una vez que el virus ha entrado en contacto con la célula. Los resultados obtenidos indican que el modo de acción de los AcMs 47F y 101F es distinto que el del péptido F478-516 de la RHB y que el compuesto de bajo peso molecular BMS-433771. Así los AcMs 47F y 101F neutralizaron la infectividad del virus antes de que éste entrase en contacto con la célula, probablemente interaccionando con la forma pre-fusión de la proteína F presente en la partícula viral infectiva y bloqueando su activación (Figura 4.3). Por el contrario, el péptido F478-516 y el compuesto BMS-433771 necesitaron estar presentes durante la infección (Figura 4.8) para ejercer su acción inhibitoria por lo que probablemente deben unirse a una forma de la proteína F en una etapa posterior a su activación. Resultados análogos se han publicado para el VIH, donde péptidos derivados de las regiones heptádicas de la glicoproteína gp41 inhiben el proceso de fusión una vez que ha ocurrido la activación de la glicoproteína gp120 por su unión al receptor celular; es decir, no son capaces de neutralizar a los viriones en ausencia de membranas celulares (Chan y Kim, 1998).

Los datos estructurales que se disponen de las regiones heptádicas de la proteína F han permitido avanzar en el conocimiento de los mecanismos de neutralización por péptidos de esas regiones. Se ha demostrado que péptidos análogos a la RHA, forman un complejo trimérico en solución, al que se incorporan los péptidos de la RHB (Lawless-Delmedico y col., 2000; Matthews y col., 2000). La cristalografía de rayos X de estos complejos reveló una estructura de seis α -hélices altamente estable donde la RHA forma un trímero de α -hélices enrolladas entre sí, recubierto antiparalelamente por tres α -hélices de la RHB (Zhao y col., 2000). Los

residuos que contribuyen a la interacción entre la RHA y la RHB son hidrofóbicos y están altamente conservados. Con todos estos datos se ha postulado que, probablemente, los péptidos derivados de la RHB, tras la activación de la proteína F, interaccionen con residuos de la RHA en un intermedio de fusión impidiendo así la formación del haz de seis α -hélices con las RHB homólogas y bloqueando los cambios conformacionales posteriores que experimenta la proteína F durante el proceso de fusión de membranas.

En cuanto a la neutralización por el compuesto BMS-433771, nuestros resultados indican que este compuesto ejerce su acción una vez que el VRSH entra en contacto con la célula; es decir, después de la activación de la proteína F. Estos resultados contrastan con lo publicado por Ciani y col., (2004b). Estos autores demostraron, que un derivado fotoactivable del BMS-433771 era capaz de unirse a un dominio hidrofóbico localizado en la RHA de la proteína F presente en las partículas del virus; es decir, antes de la activación de la proteína F. Sin embargo, esos autores no demostraron que la unión del compuesto condujese a la inactivación del virus. Podría ocurrir que el compuesto interaccionase con moléculas de proteína F en estado post-fusión que co-existan en la membrana del virus con la forma pre-fusión de la proteína, como ha sido demostrado en el caso del VPI5 (Ludwig y col., 2008), y por tanto esa unión no neutralizaría al virus.

En cuanto al mecanismo que activa el proceso de fusión de membranas, hasta el momento se desconoce cual es el evento que dispara la activación de la proteína F del VRSH. El hecho de que en la mayoría de los paramixovirus el proceso de fusión requiera la presencia de la proteína de unión al receptor, sugiere que la activación de la proteína F implica la interacción de la proteína de unión al receptor con su ligando. De esta forma se inducirían cambios conformacionales en esta proteína, que de alguna manera, se transmitirían a la proteína F, activándola para la fusión de membranas. Sin embargo, en el VRSH al igual que en el metaneumovirus humano (MNVH), ambos pertenecientes a la subfamilia *Neumovirinae*, se han aislado virus mutantes sin la proteína de unión G capaces de infectar células in vitro (Karron y col., 1997; Techaarpornkul y col., 2001; Biacchesi y col., 2004, 2005). Quizá en esta subfamilia, los virus interaccionen con la superficie celular por vías alternativas independientes de la proteína de unión, y por tanto exista un mecanismo de activación diferente, por el que se dispare en la proteína F el cambio conformacional

necesario para que se produzca la fusión de membranas. Recientemente, se ha propuesto que la interacción del dominio Arg-Gly-Asp (RGD) de la proteína F del MNVH con integrinas de la célula promueve la entrada del virus. Es probable que esta unión provoque cambios conformacionales en la proteína F necesarios para que se produzca la activación de la proteína (Cseke y col., 2009). Aunque la proteína F del VRSH carece del dominio RGD, se ha comprobado por ensayos de unión a células realizados con péptidos sintéticos y proteínas F mutantes que tienen cambiados los sitios de procesamiento proteolítico, que los aminoácidos básicos localizados en el sitio II (KKRKRR) están involucrados en la interacción de la proteína F con glicosaminoglicanos (GAGs) de la célula diana (Crim y col., 2007). Estudios previos demostraron un procesamiento proteolítico incompleto de los trímeros de proteína F presentes en el virión o en extractos de células infectadas y/o transfectadas (González-Reyes y col., 2001). Asimismo, se comprobó que se requiere el procesamiento proteolítico total de la proteína F para que se produzca la fusión. Por todo ello, es posible que la presencia de monómeros no cortados permita la unión de la proteína F por la región polibásica del sitio de corte II a la célula diana. Tras esta unión se produciría el doble procesamiento proteolítico de todos los monómeros, lo que facilitaría la activación de la proteína. Es de resaltar que la unión del AcM 47F a la proteína F podría bloquear la unión de esta proteína a la célula o bien el doble procesamiento proteolítico de la proteína F, ya en el modelo propuesto para la proteína F en su estado pre-fusión (Figura 5.1A), el sitio antigénico II donde mapea este anticuerpo (bolas verdes) se encuentra próximo a los dos sitios de procesamiento proteolítico (indicados con flechas). Sin embargo, el sitio antigénico I (bolas rojas) que induce anticuerpos parcialmente neutralizantes se localiza en una zona menos accesible y más alejada de los sitios de corte I y II.

La investigación de compuestos inhibidores de la actividad de la proteína de fusión de los virus, ha permitido el desarrollo de medidas terapéuticas contra éstos. Por ejemplo, en el caso del VIH, un péptido análogo a la RHB de la glicoproteína de superficie viral gp41 (T-20) se ha empezado a usar como tratamiento antirretroviral (Kilby y col., 2003; Lalezari y col., 2003). De forma análoga, el empleo de péptidos derivados de la RHB, podría tener importantes aplicaciones en el tratamiento profiláctico de las infecciones por el VRSH. Ya que hasta el momento sólo se

dispone del Synagis® (un AcM anti-F humanizado dirigido contra aminoácidos localizados en el sitio antigénico II, Johnson y col., 1997) como tratamiento profiláctico y su uso reiterado puede generar la aparición de virus resistentes (Zhao y col., 2004), el empleo de mezclas de AcMs anti-F y de péptidos derivados de la RHB podría ser un modo de resolver este problema.

5.2. ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES QUE RECONOCEN CONFORMACIONES DISTINTAS DE LA PROTEÍNA F

Otro objetivo de este trabajo era averiguar si se podían inducir anticuerpos en conejos que reconociesen conformaciones diferentes de la proteína F del VRSH y que se pudiesen distinguir por su capacidad neutralizante. Previamente en el laboratorio se había comprobado que cuando se eliminaban de preparaciones de inmunoglobulinas humanas los anticuerpos anti-F_{TM}- y anti-G por cromatografía de afinidad, los anticuerpos remanentes aún neutralizaban eficientemente al VRSH. Además, estos anticuerpos reconocían a la proteína F expresada en la membrana de células infectadas con el VRSH o con un virus vaccinia recombinante que expresaba la proteína F completa (VAC/F_C). Es decir, en dichas preparaciones de Igs había anticuerpos neutralizantes que reconocían a una/s conformación/es de la proteína F distinta/s de la conformación que adquiere la forma soluble F_{TM}- de la proteína F (Sastre y col., 2005).

Para obtener anticuerpos similares a los presentes en las preparaciones de Igs humanas, se inmunizaron conejos con un virus vaccinia recombinante que expresaba la proteína F completa del VRSH (VAC/F_C), es decir, la forma de la proteína F anclada a la membrana. Tras eliminar de los anticuerpos purificados del suero anti-VAC/F_C los anticuerpos dirigidos contra la proteína F_{TM}- (por cromatografía de afinidad en columnas de Sepharosa-F_{TM}-) se obtuvo un material (anti-F_{C/ΔTM}-) que: i) seguía neutralizando la infectividad del VRSH tan eficientemente como los anticuerpos de partida (Figura 4.11), ii) inhibía la formación de sincitios (Figura 4.22) y iii) reconocía a la proteína F expresada en la membrana o en extractos de células infectadas con el VRSH o con el virus VAC/F_C (Figura 4.14, 4.16 y 4.23). Los

anticuerpos anti-F_{C/TM}- retenidos en las columnas de Sepharosa-F_{TM}- neutralizaron menos eficientemente la infectividad del virus, por lo que los anticuerpos neutralizantes seguían quedando principalmente en el material no retenido en la columna (Figura 4.11). Se ha estimado que aproximadamente el 20% de los anticuerpos totales del suero están dirigidos frente a la proteína F_{TM}- (Figura 4.10). Sin embargo, no se ha podido calcular hasta el momento, qué porcentaje de anticuerpos representan los anti-F_{C/ΔTM}- respecto al total de anticuerpos del suero.

Estos resultados demuestran que la inmunización de conejos con un virus VAC/F_C induce anticuerpos altamente neutralizantes que reconoce(n) una(s) forma(s) de la proteína F distinta(s) a la que adopta el ectodominio de la proteína F cuando se expresa como una forma soluble (F_{TM}-) que presumiblemente corresponde a la forma post-fusión de la proteína. Esos anticuerpos reproducen las propiedades de los anticuerpos presentes en preparaciones de Igs humanas y que, presumiblemente, se inducen tras la infección natural por el VRSH (Sastre y col., 2005).

Para comprobar que en las preparaciones de anti-F_{C/ΔTM}- los únicos anticuerpos capaces de neutralizar al VRSH eran los dirigidos contra la proteína F, se adsorbieron esos anticuerpos a células infectadas con el virus VAC/F_C, y se obtuvo un material que ya no neutralizaba (Figura 4.21) ni inhibía la formación de sincitios (Figura 4.22).

Cuando se inmunizaron conejos con un virus vaccinia que expresa una forma soluble de la proteína F (F_{TM}-) solo se indujeron anticuerpos neutralizantes que reconocían esta forma de la proteína. Así, tras la eliminación de los anticuerpos anti-F_{TM}- utilizando una columna de Sepharosa-F_{TM}-, los anticuerpos no retenidos en la columna no neutralizaban al virus ni reconocían a la proteína F (Figura 4.28 y 4.29). Por lo tanto, la forma de presentación de la proteína F al sistema inmune de los conejos es determinante sobre el tipo de anticuerpos que se inducen tras la inmunización.

Todos estos resultados sugieren que la proteína F adopta al menos dos conformaciones distintas en la membrana del virus y de células infectadas: i) la conformación adoptada por una forma soluble de la proteína F (F_{TM}-), que corresponde a la estructura post-fusión de la proteína, y que parece ser la

mayoritaria en células infectadas con el virus e induce anticuerpos débilmente neutralizantes, aunque no se puede descartar que una fracción minoritaria de éstos sean más neutralizantes y ii) otra forma minoritaria de la proteína F que probablemente corresponda a la forma pre-fusión y que induce anticuerpos altamente neutralizantes.

La cuantificación de las distintas formas de la proteína F por citometría de flujo (Figura 4.14 y 4.16) o por ELISA (Figura 4.23), pone en evidencia que la conformación reconocida por los anticuerpos anti-F_{C/ΔTM}⁻ se encuentra de forma minoritaria, respecto a la reconocida por los anticuerpos anti-F_{C/TM}⁻, tanto en la membrana como en extractos de células infectadas con el VRSH o con el virus VAC/F_C. Puesto que esta forma minoritaria de la proteína F parece corresponder a la conformación pre-fusión metaestable de esta proteína, es razonable asumir que la proteína F tiende a adoptar la conformación post-fusión altamente estable y que sólo una fracción de las moléculas de proteína F presentes en las partículas virales mantienen la estructura pre-fusión.

Resulta paradójico que los anticuerpos anti-F_{C/TM}⁻, que reconocen a la conformación post-fusión, neutralicen la infectividad del virus antes de que éste entre en contacto con la célula; es decir, que estos anticuerpos también interaccionan aparentemente con la forma pre-fusión de la proteína F presente en la membrana de la partícula viral (Figura 4.12). Por ello, es probable que las conformaciones pre y post-fusión compartan epítopos. Dicha hipótesis, se comprobó al observar, que en un extracto de células infectadas con el VRSH, la forma de proteína F capturada por los anticuerpos anti-F_{C/TM}⁻ era también reconocida por los anticuerpos anti-F_{C/ΔTM}⁻ (Figura 4.13). Por otra parte, es posible que en las partículas del VRSH puedan co-existir las formas pre y post-fusión de la proteína F, como se ha sugerido para el VPI5 donde se ha observado por criomicroscopía electrónica la forma post-fusión de la proteína F en partículas de virus purificadas activas (Ludwig y col., 2008). Por ello, no se puede descartar que existan anticuerpos anti-F_{C/TM}⁻ que reconozcan exclusivamente a la forma post-fusión presente en la membrana viral y que neutralicen por un mecanismo de impedimento estérico que bloquee la activación de moléculas vecinas de proteína F.

La existencia de al menos dos formas de la proteína F del VRSH ya había sido sugerida anteriormente por Sakurai y col. (1999). Este laboratorio aisló, a partir de una librería cDNA obtenida a partir de mRNA de linfocitos humanos, un fragmento Fab anti-F altamente neutralizante que reconocía exclusivamente a la proteína F presente en la superficie del virus o de células infectadas con el virus, pero no a proteína F purificada. Estos autores atribuyeron la distinta reactividad a dos estadios de maduración de la proteína F, una inmadura que se presentaría desde su síntesis hasta alcanzar la superficie celular y otra, madura, que se encontraría en la membrana celular. Nuestros resultados sugieren otra interpretación. Así, el Fab obtenido por Sakurai y col. podría reconocer a la forma pre-fusión de la proteína F del VRSH, de manera análoga a como la reconocen los anticuerpos anti-F_{C/ΔTM}- descritos en esta Tesis.

En este trabajo hemos avanzado en la caracterización de las distintas formas de la proteína F presentes en extractos de células infectadas con el VRSH y que son reconocidas por los anticuerpos anti-F_C. Como se ha mencionado a lo largo de esta Tesis, se ha postulado que la proteína de fusión de los virus con envuelta adopta una conformación metaestable en la membrana del virus. Tras su activación, esa proteína experimenta una serie de cambios conformacionales durante la fusión de las membranas viral y celular para terminar en una conformación post-fusión altamente estable (Yin y col., 2005). Esta hipótesis se ve reforzada por los resultados obtenidos en distintos laboratorios. Así en el caso del VPI5, la disponibilidad de la forma pre-fusión de la proteína F purificada ha permitido realizar experimentos que han demostrado que el calentamiento de esa forma de la proteína F a 55°C mimetiza su activación y produce el cambio conformacional del estado pre-fusión al post-fusión (Connolly y col., 2006). De forma análoga, en el caso de la HA del virus de la gripe, cuya activación se asocia a la bajada de pH que ocurre en las vesículas endocíticas tras la internalización del virus (Skehel y Wiley, 2000), se ha comprobado que una forma soluble de la HA tiene una temperatura de desnaturalización de 63-65°C a pH neutro mientras que después de la exposición a pH ácido la desnaturalización de esa proteína ocurre a una temperatura superior a 90°C (Ruigrok y col., 1986). También se ha descrito que la proteína F_{TM}- del VRSH que adopta la conformación post-fusión es estable a temperaturas próximas a los 100°C (Ruiz-Argüello y col., 2004).

Por ello, era importante comparar la termoestabilidad de las distintas formas de la proteína F reconocidas por anticuerpos anti-F_C. Hemos comprobado que la reactividad de la proteína F con los anticuerpos anti-F_{C/ΔTM}- se reducía a la mitad tras la incubación de extractos de células infectadas con el VRSH a una temperatura de 65°C, mientras que la reactividad con los anticuerpos anti-F_{C/TM}- no disminuyó a la mitad hasta alcanzar temperaturas próximas a los 95°C (Figura 4.24). Este resultado es una evidencia importante en apoyo a que la forma de la proteína F reconocida por los anticuerpos anti-F_{C/ΔTM}- corresponde a la forma pre-fusión de la proteína. Hasta el momento, no hemos podido comprobar si, al igual que ocurre en otros virus, el calor dispara de forma artificial la transición de la forma pre-fusión a la post-fusión o simplemente produce la desnaturalización de la forma pre-fusión.

También se evaluó en esta Tesis si las distintas formas de la proteína F del VRSH presentaban distinta estabilidad en otras condiciones, tales como distintos pHs. Solamente se redujo la reactividad de los anticuerpos anti-F_{C/ΔTM}- con la proteína F de los extractos de células infectadas con el VRSH a pH muy ácido de 2,5, mientras que la reactividad con los anticuerpos anti-F_{C/TM}- no se vió afectada (Figura 4.25B). Conocer las condiciones a las que la proteína F pre-fusión permanece estable, abre nuevas expectativas para abordar su purificación, ya que esta inactivación a pH muy ácido, descarta las condiciones habituales de elución en cromatografía de inmunoafinidad que se utilizan para la purificación de la proteína F a partir de extractos de células infectadas con el virus VAC/F_C (Calder y col., 2000).

El tratamiento de los extractos de células infectadas con el VRSH con agentes desnaturalizantes, tales como urea (que rompe los puentes de hidrógeno que estabilizan las estructuras α-hélice), y/o reductores, como el DTT (que rompe los puentes disulfuro), no afectó a la reactividad de los anticuerpos anti-F_{C/ΔTM}- (Figura 4.25A). Esto contrasta con los resultados descritos para otras proteínas implicadas en fusión de membranas, tales como la HA de la gripe que en condiciones de urea 3,5M pasa de adoptar una forma metaestable a otra forma altamente estable (Carr y col., 1997). Aunque nuestros resultados sugieren que la proteína F del VRSH no sufre cambios drásticos en presencia de estos agentes, no se puede descartar que la desestabilización de ciertas zonas de la molécula no afecten a la reactividad con los anticuerpos anti-F_{C/ΔTM}-, cuyos epítomos no han sido identificados hasta el momento.

La purificación de una forma de la proteína F que conserve la estructura pre-fusión podría ser empleada como inmunógeno para el desarrollo de una vacuna eficaz y segura que genere anticuerpos altamente neutralizantes que reconozcan eficientemente a la proteína F en la célula diana de la misma forma que tras una infección natural. Hasta el momento, la inmunización de animales con proteína F purificada ha generado una respuesta inmune donde no existe correlación entre los altos títulos de anticuerpos estimados por ELISA y anticuerpos neutralizantes. Además, esta gran cantidad de anticuerpos forman complejos inmunes que se depositan en los pulmones provocando un aumento de la histopatología pulmonar (Murphy y col., 1990; Connors y col., 1992). Los resultados mostrados en esta Tesis indican que esto pudo ser debido a que en la inmunización se empleó proteína F purificada por cromatografía de inmunoafinidad que correspondería, probablemente, a la forma post-fusión .

Por otra parte, la obtención de la proteína F en su estructura pre-fusión, mimetizando la forma activa de la proteína F en el virus, ofrecería la posibilidad de obtener anticuerpos altamente neutralizantes dirigidos exclusivamente frente a epítomos expuestos en el virión. Estos anticuerpos podrían tener importantes aplicaciones en el tratamiento profiláctico de la infección por el VRSH, como ha sido el caso del Synagis® (Johnson y col., 1997).

Los resultados mostrados en esta Tesis corroboran la importancia de los anticuerpos anti-F en la neutralización de la infección por el VRSH. Asimismo, pone de manifiesto la existencia de distintas formas de la proteína F que son reconocidas diferencialmente por anticuerpos inducidos tras la inmunización con el virus VAC/F_C. Esto, a su vez, abre la posibilidad de dirigir la respuesta inmune frente a los epítomos de la proteína F más relevantes en la neutralización del VRSH, por medio de la presentación al sistema inmune de la proteína F completa anclada en la membrana. Este trabajo amplía también el conocimiento de los mecanismos por los que distintos agentes pueden bloquear la funcionalidad de la proteína F en distintas etapas del proceso de fusión membranas. Todo esto, abre nuevas expectativas en la búsqueda de alternativas a las inmunoprofilaxis activa y pasiva frente al VRSH, de las que se dispone en la actualidad.

6. CONCLUSIONES

1. Anticuerpos monoclonales (AcMs) que reconocen distintos epítomos en la proteína F del virus respiratorio sincitial humano (VRSH) difieren en su capacidad neutralizante.
2. No hay una correlación entre la unión de anticuerpos monoclonales y sueros policlonales anti-F a la proteína F, estimada por ELISA, y su capacidad neutralizante.
3. Tampoco se correlaciona la capacidad neutralizante y la afinidad de los AcMs o fragmentos Fab por la proteína F.
4. En algunos casos, la bivalencia de los AcMs es imprescindible para neutralizar parcialmente la infectividad del virus. Esto se debe, probablemente, a que esos AcMs producen el entrecruzamiento de moléculas de proteína F. Por el contrario, dicha bivalencia no es imprescindible en la neutralización por otros anticuerpos que inhiben completamente la infectividad del virus.
5. Distintos agentes pueden bloquear el proceso de fusión de membranas mediado por la proteína F en distintas etapas del mismo. Así, los AcMs anti-F altamente neutralizantes inhiben la infectividad del virus antes de que entre en contacto con la célula, presumiblemente por su unión a la forma pre-fusión de la proteína F. Sin embargo, péptidos derivados de la RHB de la proteína F y compuestos de bajo peso molecular necesitan estar presentes durante el proceso de entrada del virus en la célula para ejercer su actividad inhibidora; probablemente porque interaccionen con algún intermedio de la proteína F que se genere durante el proceso de fusión de membranas.

6. La inmunización de conejos con un virus vaccinia recombinante que expresa la proteína F del VRSH induce la producción de anticuerpos neutralizantes que reconocen, al menos, dos formas distintas de esa proteína. Una de estas formas es la que adopta el ectodominio de la proteína F cuando se expresa como forma soluble (F_{TM^-}) y que corresponde probablemente a la estructura post-fusión altamente estable de la proteína F. Esta forma parece ser la mayoritaria en células infectadas por el VRSH. La otra forma minoritaria de la proteína F es menos estable y corresponde probablemente a la estructura pre-fusión de la molécula.
7. La forma de presentación de la proteína F al sistema inmune es determinante sobre el tipo de anticuerpos que se inducen tras la inmunización de conejos.
8. La obtención de la proteína F en su conformación pre-fusión permitirá la búsqueda de nuevos anticuerpos altamente neutralizantes dirigidos frente a epítomos exclusivos de esta forma de la proteína. Estos anticuerpos, a su vez, ofrecerán nuevas alternativas para el tratamiento profiláctico/terapéutico de las infecciones por el VRSH.

7. BIBLIOGRAFÍA

- **Ahmadian, G., Chambers, P. & Easton, A. J. (1999).** Detection and characterization of proteins encoded by the second ORF of the M2 gene of pneumoviruses. *J Gen Virol* **80** (Pt 8), 2011-2016.
- **Akerlind, B., Norrby, E., Orvell, C. & Mufson, M. A. (1988).** Respiratory syncytial virus: heterogeneity of subgroup B strains. *J Gen Virol* **69** (Pt 9), 2145-2154.
- **Alwan, W. H. & Openshaw, P. J. (1993).** Distinct patterns of T- and B-cell immunity to respiratory syncytial virus induced by individual viral proteins. *Vaccine* **11**, 431-437.
- **American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases (1996).** Reassessment of the indications for ribavirin therapy in respiratory syncytial virus infections. *Pediatrics*. **97**, 137-40
- **Anderson, L. J., Hierholzer, J. C., Tsou, C., Hendry, R. M., Fernie, B. F., Stone, Y. & McIntosh, K. (1985).** Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J Infect Dis* **151**, 626-633.
- **Anderson, L. J., Bingham, P. & Hierholzer, J. (1988).** Neutralization of respiratory syncytial virus by individual mixtures of F and G protein monoclonal antibodies. *J Virol* **62**, 4232-4238.
- **Arbiza, J., Taylor, G., López, J. A., Furze, J., Wyld, S., Whyte, P., Stott, E. J., Wertz, G., Sullender, W., Trudel, M. & et al. (1992).** Characterization of two antigenic sites recognized by neutralizing monoclonal antibodies directed against the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* **73** (Pt 9), 2225-2234.
- **Baker, K. A., Dutch, R. E., Lamb, R. A. & Jardetzky, T. S. (1999).** Structural basis for paramyxovirus-mediated membrane fusion. *Mol Cell* **3**, 309-319.
- **Barbey-Martín, C., Gigant, B., Bizebard, T., Calder, L. J., Wharton, S. A., Skehel, J. J. & Knossow, M. (2002).** An antibody that prevents the hemagglutinin low pH fusogenic transition. *Virology* **294**, 70-74.
- **Beeler, J. A. & van Wyke Coelingh, K. (1989).** Neutralization epitopes of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus: effect of mutation upon fusion function. *J Virol* **63**, 2941-2950.
- **Bembridge, G. P., López, J. A., Bustos, R., Melero, J. A., Cook, R., Mason, H. & Taylor, G. (1999).** Priming with a secreted form of the fusion protein of respiratory syncytial virus (RSV) promotes interleukin-4 (IL-4) and IL-5 production but not pulmonary eosinophilia following RSV challenge. *J Virol* **73**, 10086-10094

- **Bermingham, A. & Collins, P. L. (1999).** The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11259-11264.
- **Biacchesi, S., Pham, Q. N., Skiadopoulos, M. H., Murphy, B. R., Collins, P. L. & Buchholz, U. J. (2005).** Infection of nonhuman primates with recombinant human metapneumovirus lacking the SH, G, or M2-2 protein categorizes each as a nonessential accessory protein and identifies vaccine candidates. *J Virol* **79**, 12608-12613.
- **Biacchesi, S., Skiadopoulos, M. H., Yang, L., Lamirande, E. W., Tran, K. C., Murphy, B. R., Collins, P. L. & Buchholz, U. J. (2004).** Recombinant human Metapneumovirus lacking the small hydrophobic SH and/or attachment G glycoprotein: deletion of G yields a promising vaccine candidate. *J Virol* **78**, 12877-12887.
- **Blount, R. E., Jr., Morris, J. A. & Savage, R. E. (1956).** Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med* **92**, 544-549.
- **Boeckh, M., Berrey, M. M., Bowden, R. A., Crawford, S. W., Balsley, J. & Corey, L. (2001).** Phase 1 evaluation of the respiratory syncytial virus-specific monoclonal antibody palivizumab in recipients of hematopoietic stem cell transplants. *J Infect Dis* **184**, 350-354.
- **Bourgeois, C., Corvaisier, C., Bour, J. B., Kohli, E. & Pothier, P. (1991).** Use of synthetic peptides to locate neutralizing antigenic domains on the fusion protein of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* **72 (Pt 5)**, 1051-1058.
- **Bossert, B., Marozin, S. & Conzelmann, K. K. (2003).** Nonstructural proteins NS1 and NS2 of bovine respiratory syncytial virus block activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* **77**, 8661-8668.
- **Boyce, T. G., Mellen, B. G., Mitchel, E. F., Jr., Wright, P. F. & Griffin, M. R. (2000).** Rates of hospitalization for respiratory syncytial virus infection among children in medicaid. *J Pediatr* **137**, 865-870.
- **Brioen, P., Dekegel, D. & Boeye, A. (1983).** Neutralization of poliovirus by antibody-mediated polymerization. *Virology* **127**, 463-468.
- **Buchholz, U. J., Finke, S. & Conzelmann, K. K. (1999).** Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol* **73**, 251-259

- **Bukreyev, A., Whitehead, S. S., Murphy, B. R. & Collins, P. L. (1997).** Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse. *J Virol* **71**, 8973-8982.
- **Bukreyev, A., Yang, L., Fricke, J., Cheng, L., Ward, J. M., Murphy, B. R. & Collins, P. L. (2008).** The secreted form of respiratory syncytial virus G glycoprotein helps the virus evade antibody-mediated restriction of replication by acting as an antigen decoy and through effects on Fc receptor-bearing leukocytes. *J Virol* **82**, 12191-12204
- **Calder, L. J., Gonzalez-Reyes, L., García-Barreno, B., Wharton, S. A., Skehel, J. J., Wiley, D. C. & Melero, J. A. (2000).** Electron microscopy of the human respiratory syncytial virus fusion protein and complexes that it forms with monoclonal antibodies. *Virology* **271**, 122-131.
- **Cane, P. A., Matthews, D. A. & Pringle, C. R. (1994).** Analysis of respiratory syncytial virus strain variation in successive epidemics in one city. *J Clin Microbiol* **32**, 1-4.
- **Cane, P. A. & Pringle, C. R. (1991).** Respiratory syncytial virus heterogeneity during an epidemic: analysis by limited nucleotide sequencing (SH gene) and restriction mapping (N gene). *J Gen Virol* **72** (Pt 2), 349-357.
- **Cane, P. A., Weber, M., Sanneh, M., Dackour, R., Pringle, C. R. & Whittle, H. (1999).** Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in The Gambia. *Epidemiol Infect* **122**, 155-160.
- **Cannon, M. J., Openshaw, P. J. & Askonas, B. A. (1988).** Cytotoxic T cells clear virus but augment lung pathology in mice infected with respiratory syncytial virus. *J Exp Med* **168**, 1163-1168.
- **Cárdenas, S., Auais, A. & Piedimonte, G. (2005).** Palivizumab in the prophylaxis of respiratory syncytial virus infection. *Expert Rev Anti Infect Ther* **3**, 719-726.
- **Carr, C. M., Chaudhry, C. & Kim, P. S. (1997).** Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14306-14313.
- **Castagné, N., Barbier, A., Bernard, J., Rezaei, H., Huet, J. C., Henry, C., Da Costa, B. & Eleouet, J. F. (2004).** Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus P-P and P-N protein complexes and localization of the P protein oligomerization domain. *J Gen Virol* **85**, 1643-1653.

- **Chambers, P., Barr, J., Pringle, C. R. & Easton, A. J. (1990).** Molecular cloning of pneumonia virus of mice. *J Virol* **64**, 1869-1872.
- **Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M. & Kim, P. S. (1997).** Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**, 263-273.
- **Chan, D. C. & Kim, P. S. (1998).** HIV entry and its inhibition. *Cell* **93**, 681-684.
- **Cianci, C., Genovesi, E. V., Lamb, L., Medina, I., Yang, Z., Zadjura, L., Yang, H., D'Arienzo, C., Sin, N., Yu, K. L., Combrink, K., Li, Z., Colonno, R., Meanwell, N., Clark, J. & Krystal, M. (2004a).** Oral efficacy of a respiratory syncytial virus inhibitor in rodent models of infection. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 2448-2454.
- **Cianci, C., Langley, D. R., Dischino, D. D., Sun, Y., Yu, K. L., Stanley, A., Roach, J., Li, Z., Dalterio, R., Colonno, R., Meanwell, N. A. & Krystal, M. (2004b).** Targeting a binding pocket within the trimer-of-hairpins: small-molecule inhibition of viral fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15046-15051.
- **Cianci, C., Yu, K. L., Combrink, K., Sin, N., Pearce, B., Wang, A., Civiello, R., Voss, S., Luo, G., Kadow, K., Genovesi, E. V., Venables, B., Gulgeze, H., Trehan, A., James, J., Lamb, L., Medina, I., Roach, J., Yang, Z., Zadjura, L., Colonno, R., Clark, J., Meanwell, N. & Krystal, M. (2004c).** Orally active fusion inhibitor of respiratory syncytial virus. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 413-422.
- **Coiras, M. T., Pérez-Breña, P., García, M. L. & Casas, I. (2003).** Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assay. *J Med Virol* **69**, 132-144.
- **Collins, P. L., and J.E. Crowe. (2007).** Respiratory syncytial virus and metapneumovirus, p 1601-1646. *In* D. M. Knipe, P. M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martín, B. Roizman, and S.E. Straus (ed), *Fields Virology*, 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- **Collins, P. L., Dickens, L. E., Buckler-White, A., Olmsted, R. A., Spriggs, M. K., Camargo, E. & Coelingh, K. V. (1986).** Nucleotide sequences for the gene junctions of human respiratory syncytial virus reveal distinctive features of intergenic structure and gene order. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4594-4598.
- **Collins, P. L., Hill, M. G., Cristina, J. & Grosfeld, H. (1996).** Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 81-85.

- **Collins, P. L., Huang, Y. T. & Wertz, G. W. (1984a).** Identification of a tenth mRNA of respiratory syncytial virus and assignment of polypeptides to the 10 viral genes. *J Virol* **49**, 572-578.
- **Collins, P. L., Huang, Y. T. & Wertz, G. W. (1984b).** Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion (F) glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 7683-7687.
- **Collins, P. L. & Mottet, G. (1991).** Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* **72** (Pt 12), 3095-3101.
- **Collins, P. L. & Mottet, G. (1992).** Oligomerization and post-translational processing of glycoprotein G of human respiratory syncytial virus: altered O-glycosylation in the presence of brefeldin A. *J Gen Virol* **73** (Pt 4), 849-863.
- **Collins, P. L. & Mottet, G. (1993).** Membrane orientation and oligomerization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* **74** (Pt 7), 1445-1450.
- **Collins, P. L., Olmsted, R. A., Spriggs, M. K., Johnson, P. R. & Buckler-White, A. J. (1987).** Gene overlap and site-specific attenuation of transcription of the viral polymerase L gene of human respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 5134-5138.
- **Collins, P. L. & Wertz, G. W. (1983).** cDNA cloning and transcriptional mapping of nine polyadenylated RNAs encoded by the genome of human respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 3208-3212.
- **Collins, P. L. & Wertz, G. W. (1985).** The envelope-associated 22K protein of human respiratory syncytial virus: nucleotide sequence of the mRNA and a related polytranscript. *J Virol* **54**, 65-71.
- **Collins, P. L. & Wertz, G. W. (1985).** Nucleotide sequences of the 1B and 1C nonstructural protein mRNAs of human respiratory syncytial virus. *Virology* **143**, 442-451.
- **Connolly, S. A., Leser, G. P., Yin, H. S., Jardetzky, T. S. & Lamb, R. A. (2006).** Refolding of a paramyxovirus F protein from prefusion to postfusion conformations observed by liposome binding and electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17903-17908.
- **Connors, M., Collins, P. L., Firestone, C. Y. & Murphy, B. R. (1991).** Respiratory syncytial virus (RSV) F, G, M2 (22K), and N proteins each induce resistance to RSV challenge, but resistance induced by M2 and N proteins is relatively short-lived. *J Virol* **65**, 1634-1637.

- **Connors, M., Collins, P. L., Firestone, C. Y., Sotnikov, A. V., Waitze, A., Davis, A. R., Hung, P. P., Chanock, R. M. & Murphy, B. R. (1992).** Cotton rats previously immunized with a chimeric RSV FG glycoprotein develop enhanced pulmonary pathology when infected with RSV, a phenomenon not encountered following immunization with vaccinia--RSV recombinants or RSV. *Vaccine* **10**, 475-484.
- **Crill, W. D. & Roehrig, J. T. (2001).** Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J Virol* **75**, 7769-7773.
- **Crim, R. L., Audet, S.A., Feldman, S.A., Mostowski, H.S & Beeler, J.A. (2007).** Identification of linear heparin-binding peptides derived from human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein that inhibit infectivity. *J. Virol* **81**, 261-271.
- **Cristina, J., López, J. A., Albo, C., García-Barreno, B., García, J., Melero, J. A. & Portela, A. (1990).** Analysis of genetic variability in human respiratory syncytial virus by the RNase A mismatch cleavage method: subtype divergence and heterogeneity. *Virology* **174**, 126-134.
- **Cristina, J., Moya, A., Arbiza, J., Russi, J., Hortal, M., Albo, C., García-Barreno, B., García, O., Melero, J. A. & Portela, A. (1991).** Evolution of the G and P genes of human respiratory syncytial virus (subgroup A) studied by the RNase a mismatch cleavage method. *Virology* **184**, 210-218.
- **Crowe, J. E., Jr. (1999).** Host responses to respiratory virus infection and immunization. *Curr Top Microbiol Immunol* **236**, 191-214.
- **Cseke, G., Maginnis, M. S., Cox, R. G., Tollefson, S. J., Podsiad, A. B., Wright, D. W., Dermody, T. S. & Williams, J. V. (2009).** Integrin alphavbeta1 promotes infection by human metapneumovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 1566-1571.
- **Curran, J. (1998).** A role for the Sendai virus P protein trimer in RNA synthesis. *J Virol* **72**, 4274-4280.
- **Curran, J., Boeck, R., Lin-Marq, N., Lupas, A. & Kolakofsky, D. (1995).** Paramyxovirus phosphoproteins form homotrimers as determined by an epitope dilution assay, via predicted coiled coils. *Virology* **214**, 139-149.
- **Chan, D. C. & Kim, P. S. (1998).** HIV entry and its inhibition. *Cell* **93**, 681-684.
- **Chandwani, S., Borkowsky, W., Krasinski, K., Lawrence, R. & Welliver, R. (1990).** Respiratory syncytial virus infection in human immunodeficiency virus-infected children. *J Pediatr* **117**, 251-254.

- **Chang, J. & Braciale, T. J. (2002).** Respiratory syncytial virus infection suppresses lung CD8⁺ T-cell effector activity and peripheral CD8⁺ T-cell memory in the respiratory tract. *Nat Med* **8**, 54-60.
- **Chang, J., Srikiatkachorn, A. & Braciale, T. J. (2001).** Visualization and characterization of respiratory syncytial virus F-specific CD8(+) T cells during experimental virus infection. *J Immunol* **167**, 4254-4260.
- **Chanock, R., Roizman, B. & Myers, R. (1957).** Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. *Am J Hyg* **66**, 281-290.
- **Delgado, M. F., Coviello, S., Monsalvo, A. C., Melendi, G. A., Hernandez, J. Z., Batalle, J. P., Díaz, L., Trento, A., Chang, H. Y., Mitzner, W., Ravetch, J., Melero, J. A., Irusta, P. M. & Polack, F. P. (2009).** Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease. *Nat Med* **15**, 34-41.
- **Dickens, L. E., Collins, P. L. & Wertz, G. W. (1984).** Transcriptional mapping of human respiratory syncytial virus. *J Virol* **52**, 364-369.
- **Domachowske, J. B. & Rosenberg, H. F. (1999).** Respiratory syncytial virus infection: immune response, immunopathogenesis, and treatment. *Clin Microbiol Rev* **12**, 298-309.
- **Douglas, J. L., Panis, M. L., Ho, E., Lin, K. Y., Krawczyk, S. H., Grant, D. M., Cai, R., Swaminathan, S., Chen, X. & Cihlar, T. (2005).** Small molecules VP-14637 and JNJ-2408068 inhibit respiratory syncytial virus fusion by similar mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2460-2466.
- **Dulbecco, R., Freeman, G. (1959).** Plaque production by the polyoma virus. *Virology* **8**, 396-7.
- **Eckert, D. M. & Kim, P. S. (2001).** Design of potent inhibitors of HIV-1 entry from the gp41 N-peptide region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11187-11192.
- **Englund, J. A., Anderson, L. J. & Rhame, F. S. (1991).** Nosocomial transmission of respiratory syncytial virus in immunocompromised adults. *J Clin Microbiol* **29**, 115-119.
- **Escribano-Romero, E., Rawling, J., García-Barreno, B. & Melero, J. A. (2004).** The soluble form of human respiratory syncytial virus attachment protein differs from the membrane-bound form in its oligomeric state but is still capable of binding to cell surface proteoglycans. *J Virol* **78**, 3524-3532.

- **Falsey, A. R. (2005).** Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *Exp Lung Res* **31 Suppl 1**, 77.
- **Falsey, A. R., Cunningham, C. K., Barker, W. H., Kouides, R. W., Yuen, J. B., Menegus, M., Weiner, L. B., Bonville, C. A. & Betts, R. F. (1995).** Respiratory syncytial virus and influenza A infections in the hospitalized elderly. *J Infect Dis* **172**, 389-394.
- **Falsey, A. R. & Walsh, E. E. (2000).** Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin Microbiol Rev* **13**, 371-384.
- **Fearns, R. & Collins, P. L. (1999a).** Model for polymerase access to the overlapped L gene of respiratory syncytial virus. *J Virol* **73**, 388-397.
- **Fearns, R. & Collins, P. L. (1999b).** Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J Virol* **73**, 5852-5864.
- **Fransen, H., Sterner, G., Forsgren, M., Heigl, Z., Wolontis, S., Svedmyr, A. & Tunevall, G. (1967).** Acute lower respiratory illness in elderly patients with respiratory syncytial virus infection. *Acta Med Scand* **182**, 323-330.
- **Freihorst, J. & Ogra, P. L. (2001).** Mucosal immunity and viral infections. *Ann Med* **33**, 172-177.
- **Fuentes, S., Tran, K.C., Luthra, P., Teng, M.N., & He, B. (2007).** Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein. *J Virol* **81** (15), 8361-6.
- **Gan, S. W., Ng, L., Lin, X., Gong, X. & Torres, J. (2008).** Structure and ion channel activity of the human respiratory syncytial virus (hRSV) small hydrophobic protein transmembrane domain. *Protein Sci* **17**, 813-820.
- **García-Barreno, B., Delgado, T. & Melero, J. A. (1996).** Identification of protein regions involved in the interaction of human respiratory syncytial virus phosphoprotein and nucleoprotein: significance for nucleocapsid assembly and formation of cytoplasmic inclusions. *J Virol* **70**, 801-808.
- **García-Barreno, B., Palomo, C., Peñas, C., Delgado, T., Pérez-Breña, P. & Melero, J. A. (1989).** Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins. *J Virol* **63**, 925-932.
- **García-Barreno, B., Portela, A., Delgado, T., López, J. A. & Melero, J. A. (1990).** Frame shift mutations as a novel mechanism for the generation of neutralization resistant mutants of human respiratory syncytial virus. *Embo J* **9**, 4181-4187.

- **García-Barreno, B., Steel, J., Payá, M., Martínez-Sóbrido, L., Delgado, T., Yeo, R. P. & Melero, J. A. (2005).** Epitope mapping of human respiratory syncytial virus 22K transcription antitermination factor: role of N-terminal sequences in protein folding. *J Gen Virol* **86**, 1103-1107.
- **García, J., García-Barreno, B., Vivo, A. & Melero, J. A. (1993).** Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein. *Virology* **195**, 243-247.
- **García, O., Martín, M., Dopazo, J., Arbiza, J., Frabasile, S., Russi, J., Hortal, M., Pérez-Breña, P., Martínez, I., García-Barreno, B. & y col. (1994).** Evolutionary pattern of human respiratory syncytial virus (subgroup A): cocirculating lineages and correlation of genetic and antigenic changes in the G glycoprotein. *J Virol* **68**, 5448-5459.
- **Garvie, D. G. & Gray, J. (1980).** Outbreak of respiratory syncytial virus infection in the elderly. *Br Med J* **281**, 1253-1254.
- **Ghildyal, R., Li, D., Peroulis, I., Shields, B., Bardin, P. G., Teng, M. N., Collins, P. L., Meanger, J. & Mills, J. (2005).** Interaction between the respiratory syncytial virus G glycoprotein cytoplasmic domain and the matrix protein. *J Gen Virol* **86**, 1879-1884.
- **Ghosh, S., Champlin, R. E., Englund, J., Giralt, S. A., Rolston, K., Raad, I., Jacobson, K., Neumann, J., Ippoliti, C., Mallik, S. & Whimbey, E. (2000).** Respiratory syncytial virus upper respiratory tract illnesses in adult blood and marrow transplant recipients: combination therapy with aerosolized ribavirin and intravenous immunoglobulin. *Bone Marrow Transplant* **25**, 751-755.
- **Glezen, W. P., Taber, L. H., Frank, A. L. & Kasel, J. A. (1986).** Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am J Dis Child* **140**, 543-546.
- **González-Reyes, L., Ruiz-Arguello, M. B., García-Barreno, B., Calder, L., López, J. A., Albar, J. P., Skehel, J. J., Wiley, D. C. & Melero, J. A. (2001).** Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9859-9864.
- **Graham, B. S., Bunton, L. A., Rowland, J., Wright, P. F. & Karzon, D. T. (1991a).** Respiratory syncytial virus infection in anti-mu-treated mice. *J Virol* **65**, 4936-4942.
- **Graham, B. S., Bunton, L. A., Wright, P. F. & Karzon, D. T. (1991b).** Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice. *J Clin Invest* **88**, 1026-1033.

- **Graham, R. C., Jr., Lundholm, U. & Karnovsky, M. J. (1965).** Cytochemical Demonstration of Peroxidase Activity with 3-Amino-9-Ethylcarbazole. *J Histochem Cytochem* **13**, 150-152.
- **Greensill, J., McNamara, P. S., Dove, W., Flanagan, B., Smyth, R. L. & Hart, C. A. (2003).** Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis* **9**, 372-375.
- **Groothuis, J. R. & Nishida, H. (2002).** Prevention of respiratory syncytial virus infections in high-risk infants by monoclonal antibody (palivizumab). *Pediatr Int* **44**, 235-241.
- **Groothuis, J. R. & Simoes, E. A. (1993).** Immunoprophylaxis and immunotherapy: role in the prevention and treatment of respiratory syncytial virus. *Int J Antimicrob Agents* **2**, 97-103.
- **Gruber, C. & Levine, S. (1983).** Respiratory syncytial virus polypeptides. III. The envelope-associated proteins. *J Gen Virol* **64 (Pt 4)**, 825-832.
- **Hall, C. B. & Douglas, R. G., Jr. (1981).** Modes of transmission of respiratory syncytial virus. *J Pediatr* **99**, 100-103.
- **Hall, C. B., Powell, K. R., MacDonald, N. E., Gala, C. L., Menegus, M. E., Suffin, S. C. & Cohen, H. J. (1986).** Respiratory syncytial viral infection in children with compromised immune function. *N Engl J Med* **315**, 77-81.
- **Hall, C. B., Walsh, E. E., Long, C. E. & Schnabel, K. C. (1991).** Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* **163**, 693-698.
- **Hallak, L. K., Spillmann, D., Collins, P. L. & Peeples, M. E. (2000).** Glycosaminoglycan sulfation requirements for respiratory syncytial virus infection. *J Virol* **74**, 10508-10513.
- **Hardy, H. & Skolnik, P. R. (2004).** Enfuvirtide, a new fusion inhibitor for therapy of human immunodeficiency virus infection. *Pharmacotherapy* **24**, 198-211.
- **Hardy, R. W. & Wertz, G. W. (1998).** The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription. *J Virol* **72**, 520-526.
- **Hardy, R. W., Harmon, S. B. & Wertz, G. W. (1999).** Diverse gene junctions of respiratory syncytial virus modulate the efficiency of transcription termination and respond differently to M2-mediated antitermination. *J Virol* **73**, 170-176.

- **He, R. T., Innis, B. L., Nisalak, A., Usawattanakul, W., Wang, S., Kalayanaroj, S. & Anderson, R. (1995).** Antibodies that block virus attachment to Vero cells are a major component of the human neutralizing antibody response against dengue virus type 2. *J Med Virol* **45**, 451-461.
- **Heminway, B. R., Yu, Y., Tanaka, Y., Perrine, K. G., Gustafson, E., Bernstein, J. M. & Galinski, M. S. (1994).** Analysis of respiratory syncytial virus F, G, and SH proteins in cell fusion. *Virology* **200**, 801-805.
- **Henderson, F. W., Clyde, W. A., Jr., Collier, A. M., Denny, F. W., Senior, R. J., Sheaffer, C. I., Conley, W. G., 3rd & Christian, R. M. (1979a).** The etiologic and epidemiologic spectrum of bronchiolitis in pediatric practice. *J Pediatr* **95**, 183-190.
- **Henderson, F. W., Collier, A. M., Clyde, W. A., Jr. & Denny, F. W. (1979b).** Respiratory-syncytial-virus infections, reinfections and immunity. A prospective, longitudinal study in young children. *N Engl J Med* **300**, 530-534.
- **Hernández, L. D., Hoffman, L. R., Wolfsberg, T. G. & White, J. M. (1996).** Virus-cell and cell-cell fusion. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 627-661.
- **Hruska, J. F., Bernstein, J. M., Douglas, R. G., Jr. & Hall, C. B. (1980).** Effects of ribavirin on respiratory syncytial virus in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **17**, 770-775.
- **Huang, Y. T., Collins, P. L. & Wertz, G. W. (1985).** Characterization of the 10 proteins of human respiratory syncytial virus: identification of a fourth envelope-associated protein. *Virus Res* **2**, 157-173..
- **Huang, Y. T. & Wertz, G. W. (1982).** The genome of respiratory syncytial virus is a negative-stranded RNA that codes for at least seven mRNA species. *J Virol* **43**, 150-157.
- **Huang, Y. T. & Wertz, G. W. (1983).** Respiratory syncytial virus mRNA coding assignments. *J Virol* **46**, 667-672.
- **Huntley, C. C., Weiss, W. J., Gazumyan, A., Buklan, A., Feld, B., Hu, W., Jones, T. R., Murphy, T., Nikitenko, A. A., O'Hara, B., Prince, G., Quartuccio, S., Raifeld, Y. E., Wyde, P. & O'Connell, J. F. (2002).** RFI-641, a potent respiratory syncytial virus inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 841-847.
- **Iorio, R. M. & Bratt, M. A. (1984).** Neutralization of Newcastle disease virus by monoclonal antibodies to the hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein: requirement for antibodies to four sites for complete neutralization. *J Virol* **51**, 445-451.

- **Jin, H., Zhou, H., Cheng, X., Tang, R., Munoz, M. & Nguyen, N. (2000).** Recombinant respiratory syncytial viruses with deletions in the NS1, NS2, SH, and M2-2 genes are attenuated in vitro and in vivo. *Virology* **273**, 210-218.
- **Jacoby, W.B. and Pastan, A. (1979).** Cell culture. *Meth. enzymol.* **53**, 345
- **Johnson, P. R. & Collins, P. L. (1988).** The fusion glycoproteins of human respiratory syncytial virus of subgroups A and B: sequence conservation provides a structural basis for antigenic relatedness. *J Gen Virol* **69 (Pt 10)**, 2623-2628.
- **Johnson, S., Griego, S. D., Pfarr, D. S., Doyle, M. L., Woods, R., Carlin, D., Prince, G. A., Koenig, S., Young, J. F. & Dillon, S. B. (1999).** A direct comparison of the activities of two humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibodies: MEDI-493 and RSHZI9. *J Infect Dis* **180**, 35-40.
- **Johnson, S., Oliver, C., Prince, G. A., Hemming, V. G., Pfarr, D. S., Wang, S. C., Dormitzer, M., O'Grady, J., Koenig, S., Tamura, J. K., Woods, R., Bansal, G., Couchenour, D., Tsao, E., Hall, W. C. & Young, J. F. (1997).** Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* **176**, 1215-1224.
- **Johnson, P. R., Spriggs, M. K., Olmsted, R. A. & Collins, P. L. (1987).** The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 5625-5629.
- **Kapikian, A. Z., Mitchell, R. H., Chanock, R. M., Shvedoff, R. A. & Stewart, C. E. (1969).** An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. *American journal of epidemiology* **89**, 405-421.
- **Karron, R. A., Buonagurio, D. A., Georgiu, A. F., Whitehead, S. S., Adamus, J. E., Clements-Mann, M. L., Harris, D. O., Randolph, V. B., Udem, S. A., Murphy, B. R. & Sidhu, M. S. (1997).** Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13961-13966.
- **Kilby, J. M. & Eron, J. J. (2003).** Novel therapies based on mechanisms of HIV-1 cell entry. *N Engl J Med* **348**, 2228-2238.
- **Kim, H. W., Arrobio, J. O., Brandt, C. D., Jeffries, B. C., Pyles, G., Reid, J. L., Chanock, R. M. & Parrott, R. H. (1973).** Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D.C. I. Importance of the virus in different respiratory tract disease syndromes and temporal distribution of infection. *Am J Epidemiol* **98**, 216-225.

- **Kim, H. W., Canchola, J. G., Brandt, C. D., Pyles, G., Chanock, R. M., Jensen, K. & Parrott, R. H. (1969).** Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *American journal of epidemiology* **89**, 422-434.
- **Knossow, M., Gaudier, M., Douglas, A., Barrere, B., Bizebard, T., Barbey, C., Gigant, B. & Skehel, J. J. (2002).** Mechanism of neutralization of influenza virus infectivity by antibodies. *Virology* **302**, 294-298.
- **Kuo, L., Fearn, R. & Collins, P. L. (1997).** Analysis of the gene start and gene end signals of human respiratory syncytial virus: quasi-templated initiation at position 1 of the encoded mRNA. *J Virol* **71**, 4944-4953.
- **Kuo, L., Grosfeld, H., Cristina, J., Hill, M. G. & Collins, P. L. (1996).** Effects of mutations in the gene-start and gene-end sequence motifs on transcription of monocistronic and dicistronic minigenomes of respiratory syncytial virus. *J Virol* **70**, 6892-6901.
- **Lalezari, J. P., Eron, J. J., Carlson, M., Cohen, C., DeJesus, E., Arduino, R. C., Gallant, J. E., Volberding, P., Murphy, R. L., Valentine, F., Nelson, E. L., Sista, P. R., Dusek, A. & Kilby, J. M. (2003).** A phase II clinical study of the long-term safety and antiviral activity of enfuvirtide-based antiretroviral therapy. *Aids* **17**, 691-698.
- **Lamb, R. A. (1993).** Paramyxovirus fusion: a hypothesis for changes. *Virology* **197**, 1-11.
- **Lamb, R. A. & Jardetzky, T. S. (2007).** Structural basis of viral invasion: lessons from paramyxovirus F. *Curr Opin Struct Biol.*
- **Lambert, D. M., Barney, S., Lambert, A. L., Guthrie, K., Medinas, R., Davis, D. E., Bucy, T., Erickson, J., Merutka, G. & Petteway, S. R., Jr. (1996).** Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2186-2191.
- **Lambert, D. M., Hambor, J., Diebold, M. & Galinski, B. (1988).** Kinetics of synthesis and phosphorylation of respiratory syncytial virus polypeptides. *J Gen Virol* **69** (Pt 2), 313-323.
- **Lambert, D. M., Pons, M. W., Mbuy, G. N. & Dorsch-Hasler, K. (1980).** Nucleic acids of respiratory syncytial virus. *J Virol* **36**, 837-846.

- **Lawless-Delmedico, M. K., Sista, P., Sen, R., Moore, N. C., Antczak, J. B., White, J. M., Greene, R. J., Leanza, K. C., Matthews, T. J. & Lambert, D. M. (2000).** Heptad-repeat regions of respiratory syncytial virus F1 protein form a six-membered coiled-coil complex. *Biochemistry* **39**, 11684-11695.
- **Levine, S., Klaiber-Franco, R. & Paradiso, P. R. (1987).** Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* **68** (Pt 9), 2521-2524.
- **Llorente, M. T., García-Barreno, B., Calero, M., Camafeita, E., López, J. A., Longhi, S., Ferron, F., Varela, P. F. & Melero, J. A. (2006).** Structural analysis of the human respiratory syncytial virus phosphoprotein: characterization of an alpha-helical domain involved in oligomerization. *J Gen Virol* **87**, 159-169.
- **López, J. A., Andreu, D., Carreno, C., Whyte, P., Taylor, G. & Melero, J. A. (1993).** Conformational constraints of conserved neutralizing epitopes from a major antigenic area of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *J Gen Virol* **74** (Pt 12), 2567-2577.
- **López, J. A., Bustos, R., Orvell, C., Berois, M., Arbiza, J., García-Barreno, B. & Melero, J. A. (1998).** Antigenic structure of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *J Virol* **72**, 6922-6928.
- **Ludwig, K., Schade, B., Bottcher, C., Korte, T., Ohlwein, N., Baljinnyam, B., Veit, M. & Herrmann, A. (2008).** Electron cryomicroscopy reveals different F1+F2 protein States in intact parainfluenza virions. *J Virol* **82**, 3775-3781.
- **Martínez, F. D., Morgan, W. J., Wright, A. L., Holberg, C. J. & Taussig, L. M. (1988).** Diminished lung function as a predisposing factor for wheezing respiratory illness in infants. *N Engl J Med* **319**, 1112-1117.
- **Martínez, I., Dopazo, J. & Melero, J. A. (1997).** Antigenic structure of the human respiratory syncytial virus G glycoprotein and relevance of hypermutation events for the generation of antigenic variants. *J Gen Virol* **78** (Pt 10), 2419-2429.
- **Martínez, I. & Melero, J. A. (1998).** Enhanced neutralization of human respiratory syncytial virus by mixtures of monoclonal antibodies to the attachment (G) glycoprotein. *J Gen Virol* **79** (Pt 9), 2215-2220.
- **Martínez, I. & Melero, J. A. (2000).** Binding of human respiratory syncytial virus to cells: implication of sulfated cell surface proteoglycans. *J Gen Virol* **81**, 2715-2722.
- **Martínez, I., Valdés, O., Delfraro, A., Arbiza, J., Russi, J. & Melero, J. A. (1999).** Evolutionary pattern of the G glycoprotein of human respiratory syncytial

viruses from antigenic group B: the use of alternative termination codons and lineage diversification. *J Gen Virol* **80** (Pt 1), 125-130.

- **Marty, C., Meylan, C., Schott, H., Ballmer-Hofer, K. & Schwendener, R. A. (2004).** Enhanced heparan sulfate proteoglycan-mediated uptake of cell-penetrating peptide-modified liposomes. *Cell Mol Life Sci* **61**, 1785-1794.
- **Matthews, J. M., Young, T. F., Tucker, S. P. & Mackay, J. P. (2000).** The core of the respiratory syncytial virus fusion protein is a trimeric coiled coil. *J Virol* **74**, 5911-5920.
- **McCullough, K. C., Smale, C. J., Carpenter, W. C., Crowther, J. R., Brocchi, E. & De Simone, F. (1987).** Conformational alteration in foot-and-mouth disease virus virion capsid structure after complexing with monospecific antibody. *Immunology* **60**, 75-82.
- **McInerney, T. L., McLain, L., Armstrong, S. J. & Dimmock, N. J. (1997).** A human IgG1 (b12) specific for the CD4 binding site of HIV-1 neutralizes by inhibiting the virus fusion entry process, but b12 Fab neutralizes by inhibiting a postfusion event. *Virology* **233**, 313-326.
- **McIntosh, K., Chanock, R. M. (1990).** Respiratory syncytial virus. En: *Virology* (Fields, B. N., Knipe, D. M. y col.. ed.), Raven Press, Nueva York, pp. 1045-1072.
- **Mills, J. (1999).** Prevention and treatment of respiratory syncytial virus infections. *Adv Exp Med Biol* **458**, 39-53.
- **Mink, M. A., Stec, D. S. & Collins, P. L. (1991).** Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology* **185**, 615-624.
- **Moss, B., Elroy-Stein, O., Mizukami, T., Alexander, W. A. & Fuerst, T. R. (1990).** Product review. New mammalian expression vectors. *Nature* **348**, 91-92.
- **Moudy, R. M., Sullender, W. M. & Wertz, G. W. (2004).** Variations in intergenic region sequences of Human respiratory syncytial virus clinical isolates: analysis of effects on transcriptional regulation. *Virology* **327**, 121-133.
- **Mufson, M. A., Orvell, C., Rafnar, B. & Norrby, E. (1985).** Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* **66** (Pt 10), 2111-2124.
- **Munir, S., Le Nouen, C., Luongo, C., Buchholz, U. J., Collins, P. L. & Bukreyev, A. (2008).** Nonstructural proteins 1 and 2 of respiratory syncytial virus suppress maturation of human dendritic cells. *J Virol* **82**, 8780-8796.

- **Murphy, B. R., Graham, B. S., Prince, G. A., Walsh, E. E., Chanock, R. M., Karzon, D. T. & Wright, P. F. (1986).** Serum and nasal-wash immunoglobulin G and A antibody response of infants and children to respiratory syncytial virus F and G glycoproteins following primary infection. *J Clin Microbiol* **23**, 1009-1014.
- **Murphy, B. R., Sotnikov, A., Paradiso, P. R., Hildreth, S. W., Jenson, A. B., Baggs, R. B., Lawrence, L., Zubak, J. J., Chanock, R. M., Beeler, J. A. & et al. (1989).** Immunization of cotton rats with the fusion (F) and large (G) glycoproteins of respiratory syncytial virus (RSV) protects against RSV challenge without potentiating RSV disease. *Vaccine* **7**, 533-540.
- **Murphy, B. R., Sotnikov, A. V., Lawrence, L. A., Banks, S. M. & Prince, G. A. (1990).** Enhanced pulmonary histopathology is observed in cotton rats immunized with formalin-inactivated respiratory syncytial virus (RSV) or purified F glycoprotein and challenged with RSV 3-6 months after immunization. *Vaccine* **8**, 497-502.
- **Navarro, J., López-Otin, C. & Villanueva, N. (1991).** Location of phosphorylated residues in human respiratory syncytial virus phosphoprotein. *J Gen Virol* **72** (Pt 6), 1455-1459.
- **Neilson, K. A. & Yunis, E. J. (1990).** Demonstration of respiratory syncytial virus in an autopsy series. *Pediatr Pathol* **10**, 491-502.
- **Norrby, E., Marusyk, H. & Orvell, C. (1970).** Morphogenesis of respiratory syncytial virus in a green monkey kidney cell line (Vero). *J Virol* **6**, 237-242.
- **Null, D., Jr., Pollara, B., Dennehy, P. H., Steichen, J., Sanchez, P. J., Givner, L. B., Carlin, D., Landry, B., Top, F. H., Jr. & Connor, E. (2005).** Safety and immunogenicity of palivizumab (Synagis) administered for two seasons. *Pediatr Infect Dis J* **24**, 1021-1023.
- **Nybakken, G. E., Oliphant, T., Johnson, S., Burke, S., Diamond, M. S. & Fremont, D. H. (2005).** Structural basis of West Nile virus neutralization by a therapeutic antibody. *Nature* **437**, 764-769.
- **Ohmit, S. E., Moler, F. W., Monto, A. S. & Khan, A. S. (1996).** Ribavirin utilization and clinical effectiveness in children hospitalized with respiratory syncytial virus infection. *J Clin Epidemiol* **49**, 963-967.
- **Olmsted, R. A. & Collins, P. L. (1989).** The 1A protein of respiratory syncytial virus is an integral membrane protein present as multiple, structurally distinct species. *J Virol* **63**, 2019-2029.

- **Olmsted, R. A., Elango, N., Prince, G. A., Murphy, B. R., Johnson, P. R., Moss, B., Chanock, R. M. & Collins, P. L. (1986).** Expression of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus by a recombinant vaccinia virus: comparison of the individual contributions of the F and G glycoproteins to host immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 7462-7466.
- **Openshaw, P. J., Clarke, S. L. & Record, F. M. (1992).** Pulmonary eosinophilic response to respiratory syncytial virus infection in mice sensitized to the major surface glycoprotein G. *Int Immunol* **4**, 493-500.
- **Palomo, C., Albar, J. P., García-Barreno, B. & Melero, J. A. (1990).** Induction of a neutralizing immune response to human respiratory syncytial virus with anti-idiotypic antibodies. *J Virol* **64**, 4199-4206.
- **Parrott, R. H., Kim, H. W., Arrobio, J. O., Hodes, D. S., Murphy, B. R., Brandt, C. D., Camargo, E. & Chanock, R. M. (1973).** Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D.C. II. Infection and disease with respect to age, immunologic status, race and sex. *Am J Epidemiol* **98**, 289-300.
- **Pérez, M., García-Barreno, B., Melero, J. A., Carrasco, L. & Guinea, R. (1997).** Membrane permeability changes induced in *Escherichia coli* by the SH protein of human respiratory syncytial virus. *Virology* **235**, 342-351.
- **Pilette, C., Godding, V., Kiss, R., Delos, M., Verbeken, E., Decaestecker, C., De Paepe, K., Vaerman, J. P., Decramer, M. & Sibille, Y. (2001).** Reduced epithelial expression of secretory component in small airways correlates with airflow obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **163**, 185-194.
- **Poch, O., Blumberg, B. M., Bougueleret, L. & Tordo, N. (1990).** Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *J Gen Virol* **71** (Pt 5), 1153-1162.
- **Polack, F. P., Irusta, P. M., Hoffman, S. J., Schiatti, M. P., Melendi, G. A., Delgado, M. F., Laham, F. R., Thumar, B., Hendry, R. M., Melero, J. A., Karron, R. A., Collins, P. L. & Kleeberger, S. R. (2005).** The cysteine-rich region of respiratory syncytial virus attachment protein inhibits innate immunity elicited by the virus and endotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8996-9001.
- **Posner, M. R., Hideshima, T., Cannon, T., Mukherjee, M., Mayer, K. H. & Byrn, R. A. (1991).** An IgG human monoclonal antibody that reacts with HIV-1/GP120, inhibits virus binding to cells, and neutralizes infection. *J Immunol* **146**, 4325-4332.

- **Prince, G. A., Hemming, V. G., Horswood, R. L., Baron, P. A. & Chanock, R. M. (1987).** Effectiveness of topically administered neutralizing antibodies in experimental immunotherapy of respiratory syncytial virus infection in cotton rats. *J Virol* **61**, 1851-1854.
- **Prince, G. A., Hemming, V. G., Horswood, R. L., Baron, P. A., Murphy, B. R. & Chanock, R. M. (1990).** Mechanism of antibody-mediated viral clearance in immunotherapy of respiratory syncytial virus infection of cotton rats. *J Virol* **64**, 3091-3092.
- **Rawling, J., García-Barreno, B. & Melero, J. A. (2008).** Insertion of the two cleavage sites of the respiratory syncytial virus fusion protein in Sendai virus fusion protein leads to enhanced cell-cell fusion and a decreased dependency on the HN attachment protein for activity. *J Virol* **82**, 5986-5998.
- **Roberts, S. R., Compans, R. W. & Wertz, G. W. (1995).** Respiratory syncytial virus matures at the apical surfaces of polarized epithelial cells. *J Virol* **69**, 2667-2673.
- **Roberts, S. R., Lichtenstein, D., Ball, L. A. & Wertz, G. W. (1994).** The membrane-associated and secreted forms of the respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G are synthesized from alternative initiation codons. *J Virol* **68**, 4538-4546.
- **Ruigrok, R. W., Martín, S. R., Wharton, S. A., Skehel, J. J., Bayley, P. M. & Wiley, D. C. (1986).** Conformational changes in the hemagglutinin of influenza virus which accompany heat-induced fusion of virus with liposomes. *Virology* **155**, 484-497.
- **Ruiz-Arguello, M. B., González-Reyes, L., Calder, L. J., Palomo, C., Martín, D., Saiz, M. J., García-Barreno, B., Skehel, J. J. & Melero, J. A. (2002).** Effect of proteolytic processing at two distinct sites on shape and aggregation of an anchorless fusion protein of human respiratory syncytial virus and fate of the intervening segment. *Virology* **298**, 317-326.
- **Ruiz-Arguello, M. B., Martín, D., Wharton, S. A., Calder, L. J., Martín, S. R., Cano, O., Calero, M., García-Barreno, B., Skehel, J. J. & Melero, J. A. (2004).** Thermostability of the human respiratory syncytial virus fusion protein before and after activation: implications for the membrane-fusion mechanism. *J Gen Virol* **85**, 3677-3687.
- **Russell, C. J. & Luque, L. E. (2006).** The structural basis of paramyxovirus invasion. *Trends Microbiol* **14**, 243-246.
- **Russell, R., Paterson, R. G. & Lamb, R. A. (1994).** Studies with cross-linking reagents on the oligomeric form of the paramyxovirus fusion protein. *Virology* **199**, 160-168.

- **Sakurai, H., Williamson, R. A., Crowe, J. E., Beeler, J. A., Poignard, P., Bastidas, R. B., Chanock, R. M. & Burton, D. R. (1999).** Human antibody responses to mature and immature forms of viral envelope in respiratory syncytial virus infection: significance for subunit vaccines. *J Virol* **73**, 2956-2962.
- **Sánchez-Seco, M. P., Navarro, J., Martínez, R. & Villanueva, N. (1995).** C-terminal phosphorylation of human respiratory syncytial virus P protein occurs mainly at serine residue 232. *J Gen Virol* **76** (Pt 2), 425-430.
- **Sastre, P., Melero, J. A., García-Barreno, B. & Palomo, C. (2004).** Comparison of antibodies directed against human respiratory syncytial virus antigens present in two commercial preparations of human immunoglobulins with different neutralizing activities. *Vaccine* **23**, 435-443.
- **Sastre, P., Melero, J. A., García-Barreno, B. & Palomo, C. (2005).** Comparison of affinity chromatography and adsorption to vaccinia virus recombinant infected cells for depletion of antibodies directed against respiratory syncytial virus glycoproteins present in a human immunoglobulin preparation. *J Med Virol* **76**, 248-255.
- **Scheid, A. & Choppin, P. W. (1977).** Two disulfide-linked polypeptide chains constitute the active F protein of paramyxoviruses. *Virology* **80**, 54-66.
- **Schlender, J., Bossert, B., Buchholz, U. & Conzelmann, K. K. (2000).** Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response. *J Virol* **74**, 8234-8242.
- **Shay, D. K., Holman, R. C., Roosevelt, G. E., Clarke, M. J. & Anderson, L. J. (2001).** Bronchiolitis-associated mortality and estimates of respiratory syncytial virus-associated deaths among US children, 1979-1997. *J Infect Dis* **183**, 16-22.
- **Siber, G. R. & Snyderman, D. R. (1992).** Use of immune globulins in the prevention and treatment of infections. *Current clinical topics in infectious diseases* **12**, 208-256.
- **Singleton, R., Dooley, L., Bruden, D., Raelson, S. & Butler, J. C. (2003).** Impact of palivizumab prophylaxis on respiratory syncytial virus hospitalizations in high risk Alaska Native infants. *Pediatr Infect Dis J* **22**, 540-545.
- **Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (1998).** Coiled coils in both intracellular vesicle and viral membrane fusion. *Cell* **95**, 871-874.
- **Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (2000).** Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* **69**, 531-569.

- **Spann, K. M., Tran, K. C. & Collins, P. L. (2005).** Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and proinflammatory cytokines. *J Virol* **79**, 5353-5362.
- **Sparer, T. E., Matthews, S., Hussell, T., Rae, A. J., García-Barreno, B., Melero, J. A. & Openshaw, P. J. (1998).** Eliminating a region of respiratory syncytial virus attachment protein allows induction of protective immunity without vaccine-enhanced lung eosinophilia. *J Exp Med* **187**, 1921-1926.
- **Srinivasakumar, N., Ogra, P. L. & Flanagan, T. D. (1991).** Characteristics of fusion of respiratory syncytial virus with HEp-2 cells as measured by R18 fluorescence dequenching assay. *J Virol* **65**, 4063-4069.
- **Stec, D. S., Hill, M. G., 3rd & Collins, P. L. (1991).** Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative-strand viruses. *Virology* **183**, 273-287
- **Storch, G. A. & Park, C. S. (1987).** Monoclonal antibodies demonstrate heterogeneity in the G glycoprotein of prototype strains and clinical isolates of respiratory syncytial virus. *J Med Virol* **22**, 345-356.
- **Stott, E. J., Taylor, G., Ball, L. A., Anderson, K., Young, K. K., King, A. M. & Wertz, G. W. (1987).** Immune and histopathological responses in animals vaccinated with recombinant vaccinia viruses that express individual genes of human respiratory syncytial virus. *J Virol* **61**, 3855-3861.
- **Sullender, W. M., Mufson, M. A., Anderson, L. J. & Wertz, G. W. (1991).** Genetic diversity of the attachment protein of subgroup B respiratory syncytial viruses. *J Virol* **65**, 5425-5434.
- **Taylor, G., Stott, E. J., Bew, M., Fernie, B. F., Cote, P. J., Collins, A. P., Hughes, M. & Jebbett, J. (1984).** Monoclonal antibodies protect against respiratory syncytial virus infection in mice. *Immunology* **52**, 137-142.
- **Techaarpornkul, S., Barretto, N. & Peeples, M. E. (2001).** Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene. *J Virol* **75**, 6825-6834.
- **Techaarpornkul, S., Collins, P. L. & Peeples, M. E. (2002).** Respiratory syncytial virus with the fusion protein as its only viral glycoprotein is less dependent on cellular glycosaminoglycans for attachment than complete virus. *Virology* **294**, 296-304.

- **Teng, M. N. & Collins, P. L. (1998).** Identification of the respiratory syncytial virus proteins required for formation and passage of helper-dependent infectious particles. *J Virol* **72**, 5707-5716.
- **Teng, M. N., Whitehead, S. S. & Collins, P. L. (2001).** Contribution of the respiratory syncytial virus G glycoprotein and its secreted and membrane-bound forms to virus replication in vitro and in vivo. *Virology* **289**, 283-296.
- **Thali, M., Moore, J. P., Furman, C., Charles, M., Ho, D. D., Robinson, J. & Sodroski, J. (1993).** Characterization of conserved human immunodeficiency virus type 1 gp120 neutralization epitopes exposed upon gp120-CD4 binding. *J Virol* **67**, 3978-3988.
- **Thomas, A. A., Brioen, P. & Boeye, A. (1985).** A monoclonal antibody that neutralizes poliovirus by cross-linking virions. *J Virol* **54**, 7-13.
- **Thomas, A. A., Vrijssen, R. & Boeye, A. (1986).** Relationship between poliovirus neutralization and aggregation. *J Virol* **59**, 479-485.
- **Valarcher, J. F., Furze, J., Wyld, S., Cook, R., Conzelmann, K. K. & Taylor, G. (2003).** Role of alpha/beta interferons in the attenuation and immunogenicity of recombinant bovine respiratory syncytial viruses lacking NS proteins. *J Virol* **77**, 8426-8439.
- **Varghese, R., Mikiyas, Y., Stewart, P. L. & Ralston, R. (2004).** Postentry neutralization of adenovirus type 5 by an antihexon antibody. *J Virol* **78**, 12320-12332.
- **Venkatesan, S., Elango, N. & Chanock, R. M. (1983).** Construction and characterization of cDNA clones for four respiratory syncytial viral genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 1280-1284.
- **Vikerfors, T., Grandien, M. & Olcen, P. (1987).** Respiratory syncytial virus infections in adults. *Am Rev Respir Dis* **136**, 561-564.
- **Walsh, E. E., Falsey, A. R. & Sullender, W. M. (1998).** Monoclonal antibody neutralization escape mutants of respiratory syncytial virus with unique alterations in the attachment (G) protein. *J Gen Virol* **79** (Pt 3), 479-487.
- **Walsh, E. E., Hall, C. B., Briselli, M., Brandiss, M.W., Hildreth, S., & Paradiso, P. (1989).** Comparison of antigenic sites of subtype-specific respiratory syncytial virus attachment protein. *J Gen Virol* **70**, 2953-2961.
- **Walsh, E. E., & Hruska, J. (1983).** Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion proteins. *J Virol* **47**, 171-177.

- **Wang, E., Sun, X., Qian, Y., Zhao, L., Tien, P. & Gao, G. F. (2003).** Both heptad repeats of human respiratory syncytial virus fusion protein are potent inhibitors of viral fusion. *Biochem Biophys Res Commun* **302**, 469-475.
- **Watt, P. J., Robinson, B. S., Pringle, C. R. & Tyrrell, D. A. (1990).** Determinants of susceptibility to challenge and the antibody response of adult volunteers given experimental respiratory syncytial virus vaccines. *Vaccine* **8**, 231-236.
- **Webster, R. G. & Laver, W. G. (1967).** Preparation and properties of antibody directed specifically against the neuraminidase of influenza virus. *J Immunol* **99**, 49-55.
- **Weissenhorn, W., Calder, L. J., Wharton, S. A., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (1998).** The central structural feature of the membrane fusion protein subunit from the Ebola virus glycoprotein is a long triple-stranded coiled coil. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6032-6036.
- **Weissenhorn, W., Dessen, A., Calder, L. J., Harrison, S. C., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (1999).** Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses. *Mol Membr Biol* **16**, 3-9.
- **Weissenhorn, W., Hinz, A. & Gaudin, Y. (2007).** Virus membrane fusion. *FEBS Lett* **581**, 2150-2155.
- **Wertz, G. W., Collins, P. L., Huang, Y., Gruber, C., Levine, S. & Ball, L. A. (1985).** Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 4075-4079.
- **Wertz, G. W., Stott, E. J., Young, K. K., Anderson, K. & Ball, L. A. (1987).** Expression of the fusion protein of human respiratory syncytial virus from recombinant vaccinia virus vectors and protection of vaccinated mice. *J Virol* **61**, 293-301.
- **Wild, C., Oas, T., McDanal, C., Bolognesi, D. & Matthews, T. (1992).** A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10537-10541.
- **Wild, C. T., Shugars, D. C., Greenwell, T. K., McDanal, C. B. & Matthews, T. J. (1994).** Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 9770-9774.

- **Wright, P. F., Karron, R. A., Belshe, R. B., Thompson, J., Crowe, J. E., Jr., Boyce, T. G., Halburnt, L. L., Reed, G. W., Whitehead, S. S., Anderson, E. L., Wittek, A. E., Casey, R., Eichelberger, M., Thumar, B., Randolph, V. B., Udem, S. A., Chanock, R. M. & Murphy, B. R. (2000).** Evaluation of a live, cold-passaged, temperature-sensitive, respiratory syncytial virus vaccine candidate in infancy. *J Infect Dis* **182**, 1331-1342.
- **Wu, H., Pfarr, D. S., Tang, Y., An, L. L., Patel, N. K., Watkins, J. D., Huse, W. D., Kiener, P. A. & Young, J. F. (2005).** Ultra-potent antibodies against respiratory syncytial virus: effects of binding kinetics and binding valence on viral neutralization. *Journal of molecular biology* **350**, 126-144.
- **Wu, S. J., Schmidt, A., Beil, E. J., Day, N. D., Branigan, P. J., Liu, C., Gutshall, L. L., Palomo, C., Furze, J., Taylor, G., Melero, J. A., Tsui, P., Del Vecchio, A. M. & Kruszynski, M. (2007).** Characterization of the epitope for anti-human respiratory syncytial virus F protein monoclonal antibody 101F using synthetic peptides and genetic approaches. *The Journal of general virology* **88**, 2719-2723.
- **Yin, H. S., Paterson, R. G., Wen, X., Lamb, R. A. & Jardetzky, T. S. (2005).** Structure of the uncleaved ectodomain of the paramyxovirus (hPIV3) fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9288-9293.
- **Yin, H. S., Wen, X., Paterson, R. G., Lamb, R. A. & Jardetzky, T. S. (2006).** Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation. *Nature* **439**, 38-44.
- **Yu, Q., Hardy, R. W. & Wertz, G. W. (1995).** Functional cDNA clones of the human respiratory syncytial (RS) virus N, P, and L proteins support replication of RS virus genomic RNA analogs and define minimal trans-acting requirements for RNA replication. *J Virol* **69**, 2412-2419.
- **Zebedee, S. L. & Lamb, R. A. (1988).** Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J Virol* **62**, 2762-2772.
- **Zhao, X., Chen, F. P. & Sullender, W. M. (2004).** Respiratory syncytial virus escape mutant derived in vitro resists palivizumab prophylaxis in cotton rats. *Virology* **318**, 608-612.
- **Zhao, X., Singh, M., Malashkevich, V. N. & Kim, P. S. (2000).** Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14172-14177.
- **Zimmer, G., Budz, L. & Herrler, G. (2001).** Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. Cleavage at two furin consensus sequences. *J Biol Chem* **276**, 31642-31650.

